

**Contribution à l'étude de la spécificité
du diagnostic sérologique de l'amibiase**

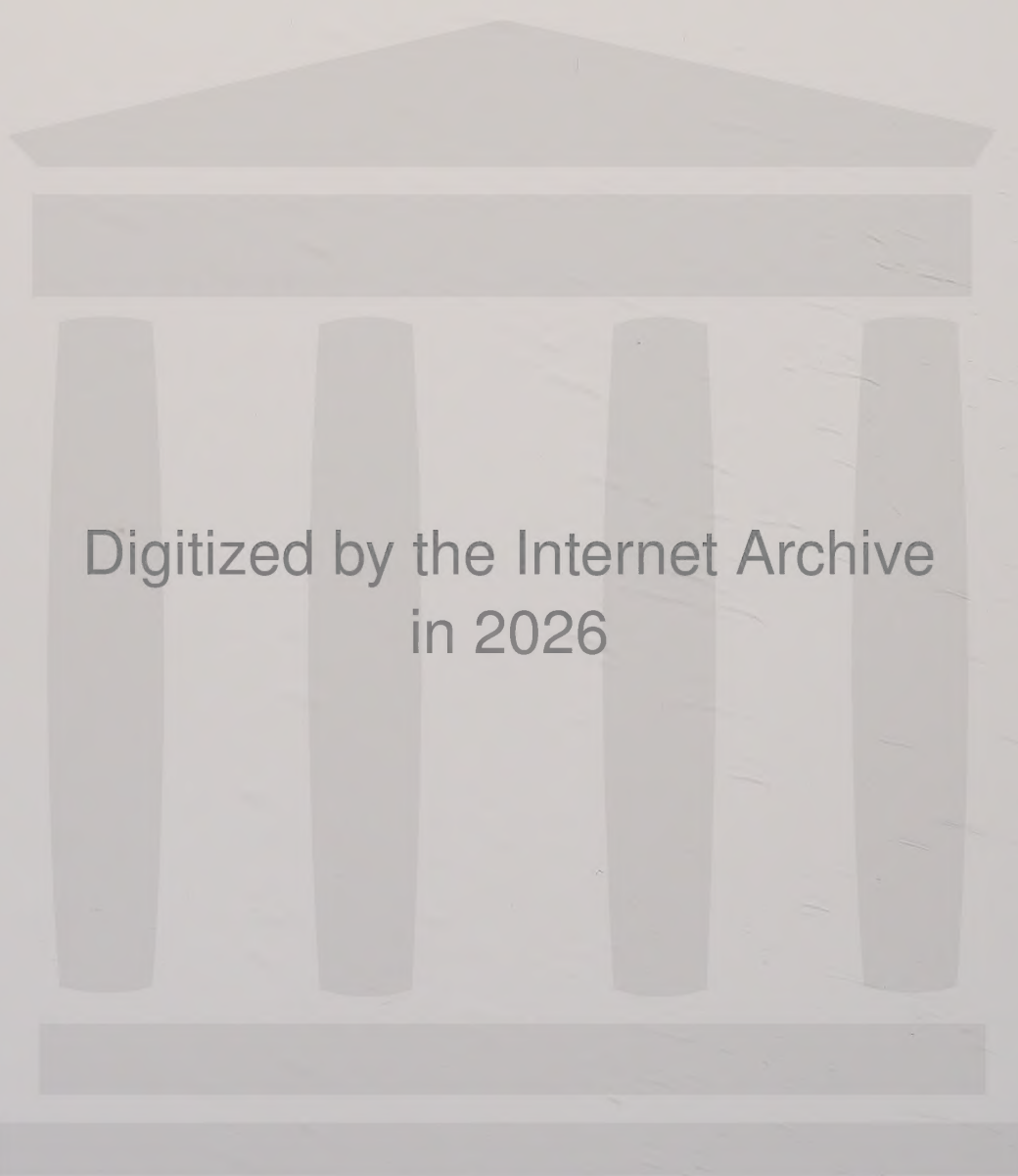
THÈSE

présentée
à l'Université Claude Bernard – Lyon I
et soutenue publiquement le 24 octobre 1980
pour obtenir le Grade de Docteur en Médecine

PAR

Philippe DUVAL

né le 5 mars 1956 à Metz (Moselle)
Ancien Élève de l'École du Service de Santé des Armées de Lyon



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546225_0019

ANNÉE 1980 N°

**Contribution à l'étude de la spécificité
du diagnostic sérologique de l'amibiase**

THÈSE

présentée
à l'Université Claude Bernard - Lyon I
et soutenue publiquement le 24 octobre 1980
pour obtenir le Grade de Docteur en Médecine

PAR

Philippe DUVAL

né le 5 mars 1956 à Metz (Moselle)
Ancien Élève de l'École du Service de Santé des Armées de Lyon

1. Semester

Die Arbeit ist zu lesen und zu verstehen
die Arbeit ist zu lesen und zu verstehen



FRANZ DÜVAL

Die Arbeit ist zu lesen und zu verstehen
die Arbeit ist zu lesen und zu verstehen

Président de l'Université : Pr. D. GERMAIN

Vice-Président : Pr. M. DUFAY

Deuxième vice-Président : M. J.C. DUPLAN

Troisième vice-Président : Mle A. ECHALON

Secrétaire Général : M. RAMBAUD

UNITÉS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE DE L'UNIVERSITÉ

MEDECINE : GRANGE-BLANCHE : Directeur M. Le Professeur P. ZECH

ALEXIS-CARREL : Directeur M. Le Professeur R. MORNEX

LYON-SUD : Directeur M. Le Professeur J. NORMAND

LYON-NORD : Directeur M. Le Docteur Y. MINAIRE (M.C.A.)

BIOLOGIE HUMAINE : Directeur : M. Le Docteur J.P. REVILLARD (M.C.A.)

TECHNIQUE DE RÉADAPTATION : Directeur : M. Le Professeur A. MORGON

SCIENCES PHARMACEUTIQUES : Directeur M. Le Professeur C.A. BIZOLLON

SCIENCES ODONTOLOGIQUES : Directeur M. Professeur J. PARRET

INSTITUT REGIONAL D'ÉDUCATION PHYSIQUE ET SPORTIVE :

Président du conseil d'U.E.R. M. Le Docteur J.J. COMTET (M.C.A.)

MATHÉMATIQUES : Directeur M. Le Professeur P. PICARD

PHYSIQUE : Directeur M. Le Professeur DELMAU J.

CHIMIE ET BIOCHIMIE : Directeur Mme A. VARAGNAT

SCIENCES DE LA NATURE : Directeur M. Le Professeur Y. LEMOIGNE

SCIENCES PHYSIOLOGIQUES : Directeur Mle Le Professeur J.F. WORBE

INSTITUT UNIVERSITAIRE DE TECHNOLOGIE N° 1 : Directeur M. A. VILLE (Professeur)

INSTITUT UNIVERSITAIRE DE TECHNOLOGIE N° 2 : Directeur M. J. GALLET (Directeur ENSAM)

PHYSIQUE NUCLÉAIRE : Directeur M. Le Professeur GUSAKOW

MÉCANIQUE : Directeur Mle Le Professeur G. COMTE-BELLOT

OBSERVATOIRE : Directeur M. G. MONNET (Astronome adjoint)

TRAVAIL REALISE DANS LE CADRE DU PROGRAMME DE RECHERCHE DE

L ' INSTITUT DE PARASITOLOGIE ET DE PATHOLOGIE

TROPICALE DE LA FACULTE DE MEDECINE DE STRASBOURG

(DIRECTEUR : PROFESSEUR M. KREMER)

• =====

=====

==

A MES PARENTS

A MES FRERES

A TOUS CEUX QUI ME SONT CHERS

.. NOTRE PRESIDENT DE THESE

Monsieur le Professeur J. COUDERT

Professeur de Parasitologie et Pathologie Exotique
à la Faculté Mixte de Médecine et de Pharmacie
de LYON

Biologiste des Hôpitaux

Nous le remercions très vivement de
l'honneur qu'il nous accorde en voulant
bien présider le Jury de notre thèse.

La qualité de son enseignement et son
enthousiasme ont été, pour nous, une
précieuse source d'enrichissement.

Qu'il trouve ici l'expression de notre
respectueuse reconnaissance et de notre
profonde admiration.

=====

A NOTRE DIRECTEUR DE THESE

Monsieur le Professeur T.T. KIEN

Maître de Conférence Agrégé

C'est à lui que nous devons notre
sujet de thèse.

Nous le remercions de son accueil
chaleureux et de la confiance qu'il
nous a témoignée.

Nous sommes honorés de pouvoir le
compter parmi nos juges.

=====

AUX MEMBRES DU JURY

Monsieur le Professeur J.P. GARIN

Biologiste des Hôpitaux

Nous avons pu, au cours de ces années d'étude, apprécier la clareté de conception et la rigueur scientifique de son enseignement.

Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de notre respectueuse considération.

=====

Mademoiselle le Professeur M. MOJON

Nous la remercions de siéger dans notre Jury

=====

A Monsieur le Professeur M. KREMER

Directeur de l'Institut de Parasitologie
et de Pathologie Exotique de STRASBOURG

Nous lui sommes reconnaissants de nous avoir ouvert les portes de son Institut.

=====

Au Docteur MOLET Bernard

Très vite, il nous a adopté dans son Equipe. Il a guidé nos premiers pas dans cette technique nouvelle pour nous, et depuis il a toujours suivi de près notre travail.

Il nous a apporté son aide avec dynamisme, gentillesse et une singulière efficacité qui a toujours fait notre admiration.

La sympathie et l'estime que nous lui portons n'ont fait que croître à son contact. C'est avec regret que nous quitterons cette Equipe dont il est l'Animateur.

Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de notre sincère gratitude et de notre fidèle dévouement.

=====

A FETTER Anny .

MERCI

=====

CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA SPECIFICITE
DU DIAGNOSTIC SEROLOGIQUE DE
L'AMIBIASE.

P L A N

- INTRODUCTION	p 1
- <u>CHAPITRE I : LES DIFFERENTES REACTIONS SEROLOGIQUES</u>	p 7
1 - <u>Réactions sérologiques avec Antigènes figurés</u>	p 9
1. 1 - Antigènes figurés vivants	p 9
1. 2 - Antigènes figurés non vivants.....	p 9
1. 2. 1 - Réaction d'immunofluorescence indirecte....	p 9
1. 2. 2 - Réaction d'immunopéroxydase indirecte.....	p 10
2 - <u>Réactions sérologiques avec Antigènes solubles</u>	p 10
2. 1 - Réaction de fixation du complément.....	p 10
2. 2 - Agglutination de particules sensibilisées.....	p 10
2. 3 - Agglutination passive.....	p 11
2. 4 - Immunoprécipitation.....	p 11
2. 4. 1 - Précipitation sur lame de MOAN.....	p 11
2. 4. 2 - Immunodiffusion : réaction d'OUCHTERLONY....	p 11
2. 4. 3 - Immunoélectrophorèse.....	p 11
2. 5 - Méthode immunoenzymologique (ELISA).....	p 12
3 - <u>Enoncés des problèmes posés par les 3 réactions</u> <u>sérologiques retenues</u>	p 14
3. 1 - Problèmes posés par l'hémagglutination.....	p 14
3. 2 - Problèmes posés par l'immunofluorescence.....	p 15
3. 3 - Problèmes posés par l'immunoélectrophorèse....	p 16
- <u>CHAPITRE II : INFLUENCE DES DIFFERENTS TYPES D'ANTIGENES</u> <u>UTILISES</u>	p 18
1 - <u>Différences des caractères antigéniques des diverses</u> <u>souches d'E. histolytica ; choix d'une souche</u>	p 20
1. 1 - En immunofluorescence.....	p 20
1. 2 - En immunodiffusion.....	p 21
1. 3 - En immunoélectrophorèse.....	p 22
2 - <u>Influence du milieu de culture</u>	p 25

- 2 - Influence des éléments microbiens associés..... p 28
- 3. 1 - Culture polybactérienne.....p 28
- 3. 2 - Culture monoxénique.....p 29
- 4 - Comparaison des caractères des antigènes obtenus
à partir de.....
cultures classiques avec germes associés
culture axénique.....p 31
- CHAPITRE III : DISCUSSION DE LA FAUSSE POSITIVITE p 37
- 1 - Cas des porteurs sains ou amibiens asymptomatiques p39
- 2 - Cas des Anticorps résiduels..... p 41
- 2. 1 - En immunofluorescence.....p 41
- 2. 2 - En immunodiffusion et immunoélectrophorèse.....p 42
- 2. 3 - En hémagglutination.....p 42
- 3. Fréquence des cas de "Faux positifs" en fonction de
la région considérée..... p 43
- CHAPITRE IV : AFFECTIONS NON AMIBIENNES AUX QUELLES
PEUVENT CORRESPONDRE DES "FAUX POSITIFS"p47
- 1 - "Faux positifs" dans le cas d'autres parasitoses..p 49
- 2 - "Faux positifs" dus aux amibes commensales non
pathogènes.....p 50
- 2. 1 - Communauté antigénique entre les diverses amibes
prouvée par l'utilisation de lapins hyperimmuns
- 2. 2 - Utilisation d'antigènes obtenus à partir d'autres
amibes qu'*E. histolytica*.....p 51
- 2. 3 - "Faux positifs" inexpliqués présentant des amibes
non pathogènes dans les selles..... p 51
- 3 - "Faux positifs" dans le cas d'affections gastro-
intestinales variées.....p 53
- 3. 1 - Symptômes gastro-intestinaux divers.....p 53
- 3. 2 - Rectocolite hémorragique et maladie de CROHN...p 54

4 - " <u>Faux positifs</u> " dans le cas d'infections microbiennes.....p	54
5 - " <u>Faux positifs</u> " dans le cas d'atteintes hépatiques.....p	
5. 1 - Cirrhose ascitique.....p	56
5. 2 - Cancer secondaire du foie.....p	56
6 - <u>Conclusions</u> ./.....p	58
- <u>CONCLUSIONS</u>p	62
- <u>TRAVAUX PERSONNELS</u>p	65
1 - <u>Matériels</u>p	67
1. 1 - Antigènes.....p	67
1. 1. 1 - Souches.....p	67
1. 1. 2 - Cultures.....p	67
1. 1. 3 - Préparation des Antigènes.....p	68
1. 2 - Sérums.....p	69
1. 2. 1 - Sérums de lapins.....p	69
1. 2. 2 - Sérums humains.....p	70
2 - <u>Méthodologie</u>p	70
2. 1 - Immunisation des lapins.....p	70
2. 2 - Techniques sérologiques.....p	71
2. 2. 1 - Réaction d'immunofluorescence indirecte....p	71
2. 2. 2 - Réaction d'immunoprécipitation en couche mince d'agarose.....p	71
2. 3 - Saturation des sérums par l'antigène milieu...p	71
3 - <u>Résultats avec les sérums de lapins hyperimmuns</u> ..p	74
3. 1 - En immunofluorescence.....p	74
3. 2 - En immunoelectrophorèse.....p	75
3. 2. 1 - Valeurs des différents antigènes.....p	75
3. 2. 2 - Rôle joué par les fractions milieux présentes dans l'antigène anibc.....p	75
a) Technique de saturation des sérums par l'antigène milieu correspondant.....p	75
b) Technique de raccordement des arcs.....p	83

4 - <u>Résultats avec les sérums humains</u>	p 74
4. 1 - Sujets en bonne santé.....	p 84
4. 1. 1 - En immunofluorescence.....	p 84
4. 1. 2 - En immunoélectrophorèse.....	p 84
a) Avec l'antigène axénique.....	p 84
- Vis à vis de l'antigène amibe.....	
- Vis à vis de l'antigène milieu.....	
b) Avec l'antigène ASb.....	p 84
4. 2 - Sujets amibiens connus.....	p 86
4. 2. 1 - En immunofluorescence.....	p 86
4. 2. 2 - En immunoprécipitation.....	p 87
a) En immunodiffusion.....	p 87
b) En immunoélectrophorèse.....	p 88
c) Conclusion.....	p 88
4. 3 - Affections non amibiennes.....	p 90
4. 3. 1 - En immunofluorescence.....	p 90
4. 3. 2 - En immunoélectrophorèse.....	p 92
4. 3. 3 - Expérience de saturation des sérums faussement positifs par un extrait de foie humain.....	p 94
5 - <u>Conclusions des travaux personnels</u>	p 95
- <u>CONCLUSIONS GENERALES</u>	p 97
- <u>BIBLIOGRAPHIE</u>	p 100

- I N T R O D U C T I O N -

L'amibiase est, après le paludisme, la deuxième endémie tropicale, ($\approx$ 10 % de la population mondiale).

L'immigration importante des ressortissants de pays d'AFRIQUE francophone,

L'attrait touristique des pays tropicaux,

Les relations économiques avec ces zones de haute endémicité amibienne,

confrontent de plus en plus notre médecine avec cette parasitose.

De plus, il ne faut pas oublier que cette maladie est cosmopolite, (la première description d'Entamoeba histolytica, le protozoaire parasite responsable de la maladie, a été faite à SAINT-PETERSBOURG, en 1875, et on rapporte, en FRANCE, de nombreux cas d'amibiases strictement autochtones - GASTAUT - 31).

Dans l'amibiase intestinale, outre la clinique, l'examen coprologique se révèle d'une importance capitale dans le diagnostic, alors que les examens sérologiques restent, dans une proportion non négligeable, négatifs, (en moyenne 30 à 40 % de réactions négatives).

Par contre, dans l'amibiase extra-intestinale ou viscérale, les réactions sérologiques sont essentielles dans

le diagnostic, alors que les examens coprologiques sont parfois négatifs. D'où l'intérêt d'assurer des réactions fiables dans leur spécificité et sensibilité. C'est ce à quoi se sont livrés de nombreux auteurs depuis que IZAR, en 1914, débute dans cette voie.

A l'époque, il utilisa, comme antigène, des selles dysentériques et des pus d'abcès hépatique et, déjà, il découvrit que l'amélioration de la fiabilité des réactions passait par la purification de l'antigène, de nombreuses protéines non amibiennes pouvant être à l'origine de "faux positifs". (MADDISON, 1965)(52).

L'antigène est l'élément de base de la réaction sérologique. Sur lui, se fixent d'éventuels anticorps, globulines fabriquées par le malade, spécifiques de l'amibiase. Le complexe ainsi formé peut être visualisé par diverses techniques sérologiques. L'on comprend donc l'importance qui doit être accordée à la recherche de la plus grande pureté de l'antigène, des protéines non amibiennes pouvant être à l'origine de réactions similaires.

L'obtention de ces antigènes a été permise grâce à la culture de l'amibe E. histolytica. Deux types d'antigènes purent être obtenus à partir de ces cultures :

- l'antigène figuré, constitué par les amibes entières,
- l'antigène soluble, obtenu à partir des amibes broyées, restituant ainsi tous leurs composants protéiques.

Les étapes successives pour l'amélioration de ces cultures ont permis :

- de simplifier les techniques de culture,
- d'augmenter leur richesse,
- et, surtout, d'obtenir des degrés de pureté de l'antigène de plus en plus grands, ce qui nous intéresse dans cette étude.

Les premières cultures furent réalisées par DRBOHLAV en 1924. Il s'agissait de cultures d'amibes

associées à la flore bactérienne qui se trouvait dans les selles lors de l'isolement. Depuis, la préparation et la purification se sont améliorées.

CLEVELAND et SANDERS, en 1930, obtiennent la première culture monobactérienne, E. histolytica étant associée à Clostridium perfringens.

PHILIPPS, en 1950, réussit le premier à cultiver E. histolytica en associant un flagellé : Trypanosoma cruzi.

MADDISON, (52), en 1965, cultivant E. histolytica avec Clostridium welchii, met en évidence, en immunodiffusion, (I.D.), et immunoélectrophorèse, (I.E.), des arcs correspondants à cette bactérie et elle pose la question quant à son rôle dans les "faux positifs".

En 1968, DIAMOND, (24), ouvre la voie en réalisant, enfin, la culture d'E. histolytica en milieu axénique.

D'un autre côté, afin d'améliorer la fiabilité du diagnostic sérologique, se développent différents types de réactions sérologiques.

Certaines de ces réactions sont abandonnées ou peu utilisées :

- soit qu'elles sont de réalisations techniques difficiles,
- soit qu'elles présentent des carences dans leur sensibilité ou spécificité,
- soit qu'elles sont supplantées par des réactions apportant plus de satisfaction.

Ces réactions doivent être des plus fiables dans leur sensibilité et spécificité. Or, de nombreux auteurs signalent des exemples de réactions positives, parfois même à des taux assez élevés, chez des personnes n'ayant jamais souffert d'amibiase.

Notre but sera de recenser les cas de "faux positifs", d'en évaluer ainsi l'importance et d'essayer d'apporter une explication.

Des réactions positives chez des sujets non amibiens sont-elles liées à la technique sérologique proprement dite, au type d'antigène utilisé ou au sérum du malade lui-même, celui-ci présentant des composants sériques responsables de ces "faux positifs" ?

Une discussion sur ces "faux positifs" nous amène donc à considérer :

1) Les différents types de réactions sérologiques

Nous évoquerons alors sommairement les tests sérologiques employés le plus couramment et essaierons d'entrevoir leurs valeurs respectives et les problèmes qui s'y rattachent.

2) Les différents types d'antigènes utilisés

La qualité de l'antigène n'aurait-elle pas une responsabilité dans cette fausse positivité ?

Pour répondre à cette question, nous comparerons les résultats obtenus avec les différents types d'antigènes utilisés. Il sera intéressant d'opposer l'antigène obtenu à partir de culture associant à E. histolytica une flore bactérienne et l'antigène obtenu à partir de culture axénique.

Nous essaierons de définir leurs qualités respectives. Peut-on rendre responsable des différents "faux positifs" rapportés par l'expérience des parasitologues l'antigène bactérien de ces cultures mixtes ?

3) Cette étude sur les cas de "faux positifs" nous amène inévitablement à discuter sur la notion de "faux positifs" ; un taux d'anticorps élevé chez un sujet pouvant alors être le résultat d'une amibiase asymptomatique ou d'une amibiase ancienne passée inaperçue avec des anticorps résiduels. Il sera alors intéressant de comparer les taux de "faux positifs" en fonction de l'indice de prévalence de la maladie dans la zone considérée.

4) Nous retracerons, enfin, les quelques exemples de "faux positifs" de la littérature, essayant de définir ainsi des affections susceptibles de correspondre à des réactions faussement positives.

Dans un second temps, nous rapportons des résultats obtenus à partir des réactions d'immunofluorescence et d'immuno-électrophorèse de sérums de lapins immunisés, de sérums de malades non amibiens mais susceptibles d'être responsables de fausse positivité, effectuées au moyen de différents antigènes axéniques et antigènes classiques associés à la flore bactérienne.

Ils nous permettront d'évaluer ces différents antigènes et de démontrer, éventuellement, les constituants à l'origine de fausse positivité.

C H A P I T R E I

LES DIFFERENTES REACTIONS

SEROLOGIQUES

De nombreuses réactions sérologiques ont été proposées pour mettre en évidence, dans le sérum des amibiens, la présence des anticorps spécifiques de la maladie.

Des travaux de recherche, effectués au cours de ces cinquante dernières années, ont pu cerner les valeurs respectives et les problèmes liés à ces différentes réactions. L'on distingue comme critères de qualité d'une réaction sérologique :

- la facilité de réalisation technique,
- la reproductibilité,
- la sensibilité, afin d'assurer le maximum de diagnostics sérologiques chez les sujets porteurs d'E. histolytica
- la spécificité, afin d'éliminer les réactions faussement positives.

o

o

o

LES DIFFERENTES REACTIONS SEROLOGIQUES

Nous allons, dans ce chapitre, considérer ces différentes réactions sérologiques afin d'en écarter certaines peu satisfaisantes et discuter , plus loin, des problèmes posés par les réactions ayant retenu notre attention.

Elles peuvent être classées en fonction de la nature de l'antigène utilisé.

1 - Réactions sérologiques avec antigènes figurés

1. 1 - Antigènes figurés vivants

Ce sont des réactions d'immobilisation des amibes, (COLE et KENT, en 1953, -14), d'agglutination des trophozoïtes et des kystes, d'inhibition du pouvoir phagocytaire d'E. histolytica.

Il suffit d'évoquer la faible sensibilité et les problèmes techniques liés à ces réactions pour comprendre qu'elles sont peu pratiquées et dénuées d'intérêt diagnostique (GEORGET, 1967, -32).

1. 2 - Antigènes figurés non vivants

1. 2. 1 - Réaction d'immunofluorescence indirecte

Actuellement, elle représente une des techniques les plus utilisées.

Etudiée initialement par GOLDMAN, en 1953, elle est adaptée à l'amibiase en FRANCE par l'Ecole Lyonnaise. Les anticorps du sérum se fixent sur les sites antigéniques de membrane de l'amibe, puis sont révélés par un sérum animal antiglobulines humaines marqué à l'isothiocyanate de fluorescéine. La réaction est lue au microscope à la lumière Ultra-Violette. Les amibes apparaissent fluorescentes en cas de réaction positive et en rouge, car colorées par le bleu d'Evans en cas de réaction négative.

1. 2. 2 - Réaction d'immunopéroxydase indirecte

Cette technique d'utilisation récente, mise au point par AVRAMEAS et collaborateurs en 1968, est basée sur le même principe que la réaction d'IF. L'antiglobuline humaine est, cette fois, marquée par une enzyme (peroxydase). L'activité peroxydase est révélée par l'eau oxygénée. En cas de réaction positive, les amibes apparaissent de couleur sépia au microscope optique ordinaire.

Cette réaction semble présenter, comme avantages supplémentaires par rapport à l'IF, la possibilité d'utilisation d'un microscope ordinaire et une plus grande facilité de lecture, (AHMED, 1977, -2).

2 - Réactions sérologiques avec antigènes solubles

2. 1 - Réaction de fixation du complément (F.C.)

Elle fut la première technique sérologique appliquée à l'amibiase, (IZAR, 1914). De nombreux travaux ont été réalisés par cette méthode. Nous retenons, comme idée d'ensemble, que cette réaction offre une sensibilité et une spécificité satisfaisantes. Néanmoins, les grandes variations notées dans les résultats devraient être éliminés par l'utilisation d'un antigène axénique standardisé, (ZROUNBA, 1974, -93).

2. 2 - Agglutination de particules sensibilisées

Ce sont, en fait, des réactions d'agglutination, l'antigène étant fixé sur les particules en suspension. Les anticorps contenus dans le sérum du malade agglutinent les particules. Seules les particules de latex sont encore utilisées.

La réaction est visible à l'oeil nu, la suspension de latex homogène et opaque devient irrégulière et translucide en cas de réaction positive.

Mise au point pour l'amibiase par MORRIS et collaborateurs en 1970, elle apparaît séduisante dans sa simplicité

d'exécution et sa reproductivité. Effectuée sur lame, elle présente un intérêt dans une enquête épidémiologique. Sur le plan diagnostique, vu les problèmes de sensibilité et surtout de spécificité qu'elle présente, il est préférable de la coupler à une réaction sérologique majeure : immunofluorescence ou immunoélectrophorèse, (NIEL et coll., 1972, -65).

2. 3 - Hémagglutination passive

C'est également une réaction d'agglutination conditionnée. L'antigène est fixé, cette fois, sur des globules rouges. Les hématies, agglutinées par l'anticorps, précipitent dans le fond du tube en formant une crêpe. En cas de réaction négative, les globules rouges sédimentent en bouton dans le culot.

Cette réaction est adaptée à l'amibiase par KESSEL et coll. en 1961.

2. 4 - Immunoprécipitation

2. 4. 1 - Précipitation sur lame de MOAN

L'antigène et l'anticorps sont déposés, en quantité égale, sur une lame, puis placés pendant 5 minutes sur un agitateur rotatif. La lecture s'effectue au microscope, une réaction positive se traduisant par l'apparition de micro-précipités.

De nombreux "faux positifs" sont signalés par cette technique, (GEORGET, 1967, -32). Nous ne bénéficions d'aucune expérience sur cette réaction, de diffusion très limitée.

2. 4. 2 - Immunodiffusion : réaction d'OUCHTERLONY

Les premiers travaux employant cette technique remontent à 1957, (NAKAMURA). Il s'agit d'une précipitation simple, l'antigène et l'anticorps diffusent à partir de puits creusés dans la gélose. Comme nous le verrons plus loin, de nombreux "faux positifs" sont rencontrés. Ceux-ci sont dûs aux extraits de flore bactérienne associée à la culture d'amibes.

L'utilisation d'antigène pur axénique ou la saturation des sérums par un antigène bactérie devrait éliminer ce problème, mais le fait que cette réaction soit peu sensible explique son intérêt réduit dans une enquête diagnostique.

Par contre, la simplicité de cette technique explique l'engouement des auteurs Sud-Africains pour cette réaction, ceci dans un but épidémiologique, (MADDISON, ELSDON-DEW, POWELL, KRUPP).

2. 4. 3 - Immunoélectrophorèse (I.E.)

Cette réaction utilise deux des propriétés des antigènes et des anticorps :

- leur mobilité dans le champ électrique,
- leur aptitude à former un précipité dans un gel d'agarose.

Les fractions de la solution antigénique sont d'abord séparées par électrophorèse. Puis, les sérums à étudier sont introduits dans une rigole. Ils diffusent passivement et forment avec les fractions antigéniques des arcs de précipitation plus ou moins séparés.

La technique d'immunoélectrophorèse permet une excellente étude analytique de l'antigène amibien. Elle offre une comparaison entre les structures antigéniques des différentes souches d'E. histolytica et des autres amibes. Son efficacité se trouve renforcée ces dernières années, grâce à l'immunoélectrophorèse bidimensionnelle.

Intéressante dans un but de recherche théorique, cette technique était peu employée à des fins diagnostiques, du fait de la quantité importante d'antigène nécessaire à la réaction.

Ce problème est, nous le verrons, partiellement résolu grâce à l'utilisation de la technique de gélose en couche mince ou l'électrosynérèse, technique basée sur le même principe mais utilisant, comme support, une bande d'acétate de cellulose.

2. 5 - Méthode immunoenzymologique (ELISA)

Cette technique a été appliquée à l'amibiase par BOS et collaborateurs, en 1977, (9).

C'est une méthode immuno-enzymologique où le complexe antigène - anticorps est fixé à un immun sérum antiglobuline humaine marqué par une enzyme. La présence de l'enzyme, donc des anticorps, est révélée par un substrat adapté donnant une réaction colorée. L'intensité de la réaction dépend de la quantité d'enzymes. On peut ainsi doser la quantité d'anticorps présents dans le sérum.

La réaction se fait dans des tubes plastiques. Les parois servent de support à l'antigène. La qualité de l'antigène et du substrat plastique exigée pour assurer une réaction fiable, semble représenter le problème principal de cette technique.

Les travaux réalisés au moyen de l'ELISA sont, jusqu'ici, moins nombreux.

ENONCES DES PROBLEMES POSES PAR LES TROIS REACTIONS SEROLOGIQUES

RETENUES

Ainsi, nous sommes amenés à étudier les réactions faussement positives dans les trois techniques les plus couramment utilisées :

- hémagglutination passive, (H.A.),
- immunofluorescence, (I.F.),
- immunoélectrophorèse, (I.E.).

Ces réactions semblent apporter le plus de satisfaction aux différents auteurs consultés. Elles sont de valeur sensiblement égale dans leur sensibilité et spécificité. Néanmoins, il est à noter l'existence de "faux positifs" inexpliqués dans ces trois réactions. Ceux-ci seront précisés dans les chapitres suivants, nous nous contentons, dans cette partie, d'évoquer succinctement les problèmes liés à ces trois techniques.

1 - Problèmes posés par l'hémagglutination

Evoquer le problème de "faux positifs" dans cette réaction nous oblige au préalable à définir, comme dans toute autre réaction, un seuil de positivité. Il se situe en moyenne entre les dilutions 1/100 et 1/200. Les variations notées sont fonction des auteurs, de la qualité et de la concentration de l'antigène utilisé. Ainsi, ce taux significatif a été fixé par :

- MITHAL (1978, -57) au 1/162,
- MADDISON (1968, -53) au 1/256,
- KRUPP (1970, -46) au 1/80, 1/160 taux bas
au 1/320, 1/640 taux moyens.

Cette réaction se révèle plus sensible que les autres réactions. Ceci ne semble pas être un avantage. Ainsi, comme nous le détaillerons de façon plus approfondie dans notre troisième chapitre, on constate de nombreux "faux positifs" inexpliqués chez des sujets sains dans les zones à forte endémie (KRUPP, 7 % de positifs inexpliqués, MADDISON 9 %).

Deux raisons à évoquer :

- le titre de la réaction ne permet pas de préciser le type d'amibiase. Des taux d'anticorps peuvent être très élevés en cas d'amibiase asymptomatique. DASGUPTA, en 1974, (19), note même des taux plus élevés en cas d'amibiase intestinale que d'amibiase tissulaire.
- la persistance prolongée, (jusqu'à 10 ans), des anticorps résiduels à une amibiase ancienne.

Cette sensibilité excessive ne semble pas épargner les pays de faible endémie. Ainsi, l'équipe française du Professeur RANQUE, à MARSEILLE, signale 9,5 % de positifs inexpliqués avec cette réaction, (JOURNE, 1978, -4)

2 - Problèmes posés par la réaction d'immunofluorescence

Nous ne répéterons pas les moults avantages de cette technique. La lecture reste le temps le plus délicat de la réaction. Elle doit être faite avec un microscope à Ultra-Violet et nécessite un minimum d'expérience. Nous prouverons que l'utilisation d'amibes cultivées sur milieu axénique facilite singulièrement la lecture.

Parler de "faux positifs" nous oblige également, pour cette réaction, à définir un seuil de positivité. Celui-ci varie également en fonction des auteurs considérés, (cf. chapitre IV), d'autant que la sensibilité de la réaction est étroitement soumise aux conditions techniques, au système optique, à la qualité des antiglobulines fluorescentes, et au type d'antigène utilisé. Des différences sont signalées suivant la souche d'amibes considérée, voire même à l'intérieur d'une même souche suivant le lot d'antigènes, (MOLINIER, 1971, -60).

Cet examen est retenu par de nombreux auteurs comme le meilleur quant à sa spécificité, sensibilité, reproductivité et à la surveillance thérapeutique qu'il permet, néanmoins nous définirons des affections non amibiennes susceptibles de révéler des réactions "faussement positives", ceci à des taux importants.

3 - Problèmes posés par la réaction d'immunoélectrophorèse

Cette réaction est d'un grand intérêt pour l'étude des structures antigéniques d'E. histolytica. De plus, elle présente un grand secours sur le plan diagnostique.

NIEL, (66), ainsi que CAPRON, (12), notent une corrélation étroite entre les réactions d'I.F. et d'I.E.. Ces deux auteurs ne constatent pas de réactions faussement positives.

Cette technique soulève trois problèmes essentiellement :

- elle nécessite l'emploi d'une quantité importante d'antigène . L'on peut pallier cette difficulté en utilisant la technique d'I.E. en couches minces d'agarose, (300 μ g d'Ag par réaction) ou encore l'électrosynérèse, (de 50 à 200 μ g)
- comme pour la réaction d'immunodiffusion, il existe des arcs de précipitation liés à l'impureté de l'antigène. Ainsi, MADDISON, 1968, (55), et SAVANAT, 1969, (74), signalent des arcs de précipitation correspondants aux éléments protéiques des bactéries associées (respectivement Clostridium perfringens et Clostridium welchii). Nous verrons si le problème peut être résolu par l'utilisation d'antigènes axéniques ou par la saturation des sérums à étudier par l'antigène milieu.
- d'autre part, cette réaction nécessite de longues manipulations ; un délai de 4 à 5 fois 24 heures s'avère indispensable pour obtenir un résultat.

Parmi les nombreuses techniques utilisées, trois réactions sérologiques se dégagent assez nettement par leur spécificité, sensibilité et facilité de réalisation. Elles sont entachées de "faux positifs", ceux-ci semblent fréquents dans la réaction d'hémagglutination. Ainsi, dans notre travail, nous serons amenés à préférer l'association immunofluorescence - immunoélectrophorèse, afin d'obtenir le meilleur résultat. L'immunofluorescence marquée par la rapidité d'exécution et l'élégance de son principe fournit des résultats valables et l'immunoélectrophorèse, malgré sa forte consommation d'antigène et ses lourdes manipulations, reste une des techniques les plus analytiques.

o o

o

C H A P I T R E I I

INFLUENCE DES DIFFERENTS TYPES

D'ANTIGENES UTILISES

Le rôle éventuel de la qualité de l'antigène dans la spécificité de la réaction sérologique, nous amène à présenter et à comparer les différents types d'antigènes utilisés dans la pratique courante.

Ainsi, nous essayerons de définir un antigène assurant à la réaction sérologique de l'amibiase les meilleurs garanties de spécificité et sensibilité.

Nous envisagerons successivement :

- 1 - les variations des réponses antigéniques en fonction des différentes souches d'E. histolytica utilisées par divers auteurs : choix d'une souche assurant une meilleure sensibilité.
- 2 - les problèmes apportés à la réaction sérologique par les différents types de milieu de culture d'amibes.
- 3 - l'intervention dans la spécificité de la réaction sérologique des microorganismes associés à E. histolytica.
- 4 - comparaison des antigènes produits à partir de culture axénique et de culture classique.

1 - DIFFERENCE DES CARACTERES ANTIGENIQUES DES DIVERSES SOUCHES D'E. HISTOLYTICA : CHOIX D'UNE SOUCHE

De nombreux auteurs ont étudié les différents caractères antigéniques de diverses souches au sein d'E. histolytica, en fonction de :

- leur taille, la morphologie du noyau,
- la température de culture,
- leur vitesse de multiplication dans les différents milieux,
- leur pathogénicité.

De nombreuses souches furent ainsi isolées et étudiées.

Certaines souches ne seraient-elles pas plus volontiers responsables de réactions sérologiques anormalement élevées, pouvant expliquer des réactions sérologiques faussement positives ?

L'étude des modifications des réponses en sérologie en fonction des souches varie suivant les techniques sérologiques utilisées. L'on peut ainsi distinguer deux groupes :

- les réactions permettant de quantifier le taux d'anticorps,
- les réactions analytiques étudiant les caractères antigéniques, (I.D., IE simple et bidimensionnelle).

Grâce au premier groupe de réactions sérologiques, les multiples auteurs considérés ne rencontraient pas de différence dans les résultats obtenus.

1.1. - Ainsi, en Immunofluorescence :

GOLDMANN, (36), en 1967, ne note pas de différence entre huit souches d'E. histolytica pathogènes, (NRS, HK 9, 22, 103, 200, Hb 301, 401, 402).

De même, comparant six souches isolées en divers points du globe, (AS, W, NS, SF, HK 9 et 200), COUDERT et Collaborateurs, (18), ne retiennent pas de différence entre les souches.

Néanmoins, l'étude de sérums de rats blancs immunisés, révèle des titres d'anticorps plus élevés pour HK 9 et 200 que pour AS, mais les auteurs mettent ces constatations sur le compte d'une moins bonne immunisation réalisée par l'antigène d'AS, celui-ci étant non stérile.

Dans cette étude, ils ne signalent pas de "faux positifs", (taux inférieurs à 1/50) chez 208 sérums témoins provenant de sujets sains ou ayant eu une autre parasitose.

Par contre, NAYEBI, (63), en 1971, signale un cas où deux souches d'E. histolytica pathogènes ne présentent pas de communauté antigénique. Il compare la souche HK 9, (isolée par examen rectoscopique sur un prisonnier de guerre coréen en 1951 et axénisée en 1968 par DIAMOND), et SHIRAZI, (isolée en 1969 en IRAN). Il constate l'absence de réponse en I.F. indirecte entre les différents antigènes et le sérum hétérologue de lapins hyperimmuns, alors que les réponses sont positives avec les sérums homologues.

Mais il n'est pas retenu de souche apportant des réactions sérologiques à des taux anormalement élevés, pouvant expliquer des "faux positifs". Tout au plus, certains auteurs signalent-ils des taux d'anticorps plus élevés, obtenus grâce à la souche HK 9, (LUNDE et DIAMOND, 1969, (51), utilisant l'hémagglutination).

1.2 - En immunodiffusion

Les auteurs employant cette méthode ne notent pas de différence entre les souches pathogènes d'E. histolytica.

Ainsi THOMPSON, (83), en 1968, étudie la correspondance antigénique de deux antigènes fabriqués à partir de cultures dites pures, produites sur milieu T.P.S.I. de

DIAMOND : HK 9 et NIH 200, provenant de deux régions du monde très éloignées. A partir de sérum de lapins hyperimmuns et de sérum de malades provenant des cinq continents et avec la réaction d'immunodiffusion, il ne note pas de différence ; les deux antigènes pouvant être utilisés indifféremment ou associés. Les réactions de fixation du complément et d'hémagglutination indirecte l'amène à la même conclusion.

De même, TALIS, (82), en 1963, constate des propriétés antigéniques identiques entre sept souches d'E. histolytica cultivées sur milieu de BOECK et DRBOHLAV.

1.3 - En immunoélectrophorèse

Technique particulièrement analytique, plusieurs auteurs ont remarqué des différences dans le nombre et les caractères des arcs de précipitation des immuns complexes, (AG-AC), en fonction des souches considérées.

KRUPP, (46), en 1966 tout d'abord, étudie huit souches pathogènes d'E. histolytica, (F 22, NRS, 200, K 9, DKB, JH, BH, JS). Elle remarque des caractères immunoélectrophorétiques communs aux souches NRS et 200, K 9 et JH, F 22 et BH. Confrontant ces différents antigènes à des sérums de lapins immunisés par F 22, NRS et 200, elle note de grandes variations dans le nombre et la localisation des arcs, (de 2 à 6 arcs), les réactions les plus marquées correspondant aux sérums homologues.

Puis, en 1977, elle étudie les variations de réponse en I.E. et H.A. chez 148 amibiens de différents continents, (CANADA, VIETNAM, AFRIQUE, INDE, Sud des ETATS-UNIS, AMERIQUE CENTRALE), donc ayant été parasités par des souches différentes d'E. histolytica. Elle utilise comme antigène HK 9 et NIH 200 sur milieu de DIAMOND. Comme en 1966, elle constate des arcs communs à toutes les populations étudiées. Elle définit ainsi quatorze protéines correspondant à la charpente antigénique d'E. histolytica. Une partie seulement de ces protéines est présente chez tous les malades.

L'auteur met cela sur le compte :

- de la faible antigénicité de certaines protéines,
- de la faible concentration de certaines protéines bien qu'elles soient très antigéniques,
- de l'existence des facteurs individuels de réponse (alimentation, tares, compétences immunologiques, état de santé antérieur).
- des variations en fonction des contacts antérieurs avec le parasite, de la fréquence et de la durée de l'infestation.

Mais, elle ne retient pas, parmi ces quatorze protéines, celles susceptibles de précipitation avec des éléments du sérum de sujets n'ayant pas été en contact avec E. histolytica.

CHANG, (13), pousse plus en avant l'analyse en comparant deux souches axénisées de E. histolytica, HK 9 et HT 31, en usant d'une I.E. bidimensionnelle et d'un fractionnement des antigènes sur colonne de SEPHADEX G 200. Il comptabilise 32 et 20 composants respectivement pour HT 31 et HK9. Le fractionnement sur colonne de SEPHADEX met en évidence quatre fractions pour HK 9 et trois fractions pour HT 31. La fraction II des deux souches présente la plus grande antigénicité. L'électrophorèse de cette fraction est strictement superposable pour les deux souches.

A partir de ces diverses expériences, la comparaison des différentes souches d'E. histolytica, pour un même milieu de culture, nous permet de conclure que :

- 1 - Les réactions sérologiques permettant de quantifier la réponse immunologique, révèlent une sensibilité équivalente quelque soit le type d'antigène utilisé, (de nombreux auteurs signalent la souche HK 9 axénisée comme un peu plus sensible).
- 2 - Les réactions sérologiques analytiques comme I.E. ou plus récemment l'I.E. bidimensionnelle révèle que l'existence de nombreuses protéines antigéniques peuvent être présentes, ou non, un "canevas" antigénique étant commun aux différentes souches.
- 3 - Dans une région d'hyperendémie, la préférence à accorder aux souches dites locales, celles-ci ayant le maximum de sensibilité.
- 4 - L'absence de réaction sérologique anormalement positive pouvant correspondre à des antigènes appartenant à certaines souches d'E. histolytica.

Nous ne reviendrons pas sur les différents types de cultures possibles d'E. histolytica, (MOLET, -60 - 1972).

Deux éléments interviennent dans la culture :

- le milieu
- les éléments microbiens associés.

2 - INFLUENCE DU MILIEU DE CULTURE

Qu'il soit diphasique ou monophasique, on distingue :

- milieu à l'oeuf (BOECK, DRBOHLAV, 1925 ; BALAMUTH, 1944),
- milieu au sang (CUTLER 1918),
- milieu au sérum coagulé + amidon (DOBELL, LAIDLAW, 1926),
- milieu à l'asparagine, (TANNABE et CHIBA, 1928),
- milieu aux extraits de foie, (CLEVELAND et COLLIER, 1930),
- milieu gelosé.

L'antigène peut être obtenu à partir d'amibes cultivées sur ces différents milieux. L'extraction des amibes du milieu revêt donc une importance capitale pour l'obtention de l'antigène le plus pur possible. L'on se heurte alors à d'importants problèmes techniques.

Ainsi, en cultivant E. histolytica sur milieu de DOBELL, de nombreux chercheurs notent une gêne à la lecture de la réaction d'I.F. liée à la présence des grains d'amidon. Les différents lavages et centrifugations ne permettent qu'une élimination partielle de ceux-ci .

L'on peut donc se demander si, du fait d'une purification incorrecte de l'antigène amibien, des protéines du milieu ne pourraient être à l'origine de "faux positifs".

Dans le cas de cultures classiques polybactériennes, KRUPP (46), en 1966, note I à 2 arcs de précipitation en I. E. dus au sérum de cheval avec des sérums de lapins ayant subi une immunisation par E. histolytica. Elle évoque la responsabilité antigénique de protéines du milieu, qui seraient adhérentes à la membrane d'E. histolytica, malgré les lavages successifs, ou incorporées et non métabolisées par l'amibe.

Les milieux axéniques ne sont pas épargnés. Dans les cultures, des ingrédients peuvent faire office d'antigènes (sérum de cheval, extrait de foie). En effet SCHNEIDER et GORDON 1968 (76), signalent l'absence de sérums de malades positifs à l'égard de l'antigène milieu, mais deux exceptions viennent entacher ses résultats dans la réaction d'hémagglutination :

- Un sérum de sujet sain dont la sérologie amibienne est négative présente une réaction au 1/16° face au sérum de cheval et au milieu TPSI (mais négatif face à l'extrait de foie).

- Un sérum de malade porteur d'une amibiase chronique présente des taux identiques face au sérum de cheval et au milieu TPSI, (1/16°), mais quadruple avec l'antigène amibien.

De même, des lapins immunisés avec TPSI ne réagissent pas avec l'antigène amibien, (HK 9). Par contre, les lapins immunisés par l'antigène amibien réagissent très légèrement au sérum de cheval mais pas au milieu TPSI.

Cet auteur conclut que les conditions d'obtention de l'antigène axénique n'apportent qu'une quantité insuffisante de milieu pour interférer ou provoquer une réaction faussement positive.

CHANG, (13), en 1979, utilisant des sérums de lapins immunisés par les souches axéniques, HK 9 et HT 31, note deux pics en immunoélectrophorèse bidimensionnelle contre le sérum de cheval. Ces deux pics ne sont pas retrouvés en utilisant les antigènes amibiens. CHANG conclut donc à la présence d'antigène sérum de cheval dans l'antigène amibe à une concentration en dessous du seuil de sensibilité en I.E. bidimensionnelle.

LUNDE et DIAMOND, (51), en 1969, arrivent aux mêmes conclusions, ne trouvant pas en I.E., I.D., H.A., de réactions croisées entre sérum de lapin anti-E. histolytica (culture axénique), et antigène-milieu et vice versa.

L'ensemble des expériences des auteurs cités ci-dessus nous amène donc à penser que :

- de toutes les façons, il est, dans ces cas, impossible de comparer les résultats obtenus à partir de sérums de malades et ceux de lapins hyperimmuns ; ces derniers étant immunisés par l'ensemble des composants de l'antigène, une fraction non spécifique à E. histolytica correspondant au milieu, y étant associée. On retient, néanmoins, la faible réponse liée à ces protéines non spécifiques.

- bien qu'il soit possible de rencontrer des sérums humains réagissant contre les protéines du milieu, celles-ci ne peuvent entraîner de réactions sérologiques faussement positives, du fait de leur trop faible quantité dans l'antigène.

- mais ces auteurs nous rappellent ainsi l'importance à accorder à la qualité de l'extraction de l'antigène. Nous ne reviendrons pas sur les différents types et techniques employées, nous rappelons seulement la facilité de l'extraction et de la purification des amibes cultivées en milieu axénique.

o

o

o

3 - INFLUENCE DES ELEMENTS MICROBIENS ASSOCIES

3.1. - Culture polybactérienne

E. histolytica est associée à diverses bactéries. En général, il s'agit de germes de la flore intestinale. BALAMUTH, (5), en 1951, à partir d'un milieu à base de jaune d'oeuf, cultive E. histolytica associée à :

- Escherichia coli commun,
- Escherichia coli anaerogènes,
- Bacille intestinal inconnu.

Il montre que cette flore mixte permet une culture plus riche en E. histolytica que l'utilisation de culture monobactérienne utilisant un des trois germes isolés.

Mais de nombreux auteurs signalent la difficulté, à partir de ces cultures, d'obtenir une purification de l'antigène, d'autant qu'il est inclus au milieu de l'amidon, (milieu de DOBELL - LAIDLAW). Des lavages et centrifugations répétés ne permettant qu'une purification imparfaite. Pour ce type d'antigène, l'utilisation des éléments figurés devrait pallier ce problème, la lecture de la réaction s'effectuant sur la morphologie du parasite.

Ainsi, GOLDMAN, (35), immunisant des lapins contre la flore bactérienne associée, ne note pas, en I.F., de réactions positives.

Etudiant 142 sérums de sujets en bonne santé ou souffrant d'affections non amibiennes, AMBROISE-THOMAS, (4), signale l'absence de "faux positifs". Il constate, néanmoins, quelques taux au 1/50 qu'il lie à la présence de germes microbiens phagocytés par l'amibe.

Grâce à la réaction d'I.F., GOLDMAN, en 1966, (35), confirme l'importance de cette flore microbienne dans la réaction sérologique. En effet, il remarque l'apparition de germes fluorescents avec certains sérums humains.

Utilisant les réactions d'H.A. et d'I.D., ALI KHAN et MEEROVITCH, (3), en 1968, ne décèlent pas de réaction entre antigène milieu, bactéries (flore associée à la culture) et des sérums d'amibiens.

SEN, (76), en 1961, tente d'éliminer les réactions positives dues à l'antigène bactérien. Pour cela, il procède pour chaque réaction, (I.D.), à un contrôle avec l'antigène bactérien seul. Il utilise un sérum de lapin ayant subi une immunisation par E. histolytica cultivée sur milieu de ROW + E. coli et Pseudomonas pyocyaneus. Ce sérum est responsable de :

- 2 bandes de précipitation contre l'antigène P. pyocyaneus,
- 3 bandes de précipitation contre l'antigène E. coli,
- face à l'antigène E. histolytica, des arcs de précipitation dont il est impossible de déterminer la spécificité avec E. histolytica.

Mais, en utilisant un sérum de lapin anti-E. coli et anti-P. pyocyaneus pour absorber l'antigène correspondant, il constate la persistance de trois arcs, lesquels disparaissant si préalablement on met en contact le sérum et l'antigène E. histolytica. L'auteur peut donc conclure que ces 3 arcs sont spécifiques d'E. histolytica.

3.2. - Culture monoxénique

Comme le signale GOLDMAN, (35), en 1966, l'utilisation d'antigène d'amibes cultivées avec un seul élément, (Trypanosoma cruzi, Mycoplasma ou Clostridium welchii) pouvait permettre de diminuer les problèmes rencontrés précédemment.

NEAL et ROBINSON, (64); en 1968, pensent que la positivité des réactions est attribuée aux antigènes spécifiques et qu'il n'existe pas d'arcs non spécifiques liés à Mycoplasma ou T. cruzi.

MADDISON (52), quant à elle, conclut à la présence d'anticorps non spécifiques de l'amibiase liées à la présence des microorganismes concomittants.

Elle utilise des souches amibiennes cultivées sur milieu à l'oeuf associées à C. welchii.

Elle étudie des sérums de lapins immunisés, des sérums d'amibiens et des sérums témoins en utilisant des techniques d'I.D. et d'I.E..

Elle constate un arc correspondant à C. welchii surtout dans le cas d'amibiases invasives, (98 % des cas d'amibiases hépatiques), et dans les dysentéries bacillaires, (73 % des cas). Les porteurs sains d'E. histolytica ne présentant pas cet arc, alors que 37 % d'entre eux ont une sérologie positive en I.D.. En I.E., l'arc correspondant à C. welchii est retrouvé à la cathode.

Comme le prouve MADDISON dans le cas d'amibiases invasives et de dysentéries bacillaires, il est donc possible d'émettre l'hypothèse de réactions non spécifiques liées à la présence d'éléments microbiens dans l'antigène réagissant face à des anticorps correspondants au passage de matériel antigénique à partir de l'intestin lésé.

o o

o

4 - COMPARAISON DES CARACTERES DES ANTIGENES OBTENUS A PARTIR DE

- CULTURES CLASSIQUES AVEC GERMES ASSOCIES
- CULTURES AXENIQUES

Outre le milieu de culture qui est différent, ces deux types de culture permettent de produire des amibes différentes par :

- leur virulence,
- leurs caractères cytochimiques,
- leur antigénicité.

Ainsi, BOS, (9), en 1977, constate que la virulence d'E. histolytica en culture décroît rapidement quand on élimine la flore bactérienne associée.

Les souches d'E. histolytica sur milieu TPSI perdent après plusieurs années leur virulence. Elles provoquent, néanmoins, une lésion granulomateuse chez le hamster si on utilise un inoculum suffisamment riche, (10^7 amibes).

Des passages successifs sur foie de hamster ou l'adjonction de cholestérol au milieu permet de restaurer la pathogénicité des amibes.

BOS se livre à une intéressante comparaison entre HK 9 axénisée et HK 9 H₂, une amibe de la même souche à laquelle on a restitué un haut degré de virulence par deux passages successifs sur foie de hamster. Il remarque un arc de plus à la cathode pour HK9 H₂ en I.E..

MICHEL, (56), en 1970, précise quelques différences existant entre les E. histolytica cultivées sur divers milieux :

- DOBELL avec flore bactérienne associée,
- Monoxénique avec Crithidia,
- Axénique ,
- Culture sur foie de hamster.

Il note des différences de taille, de caractère pathogénique et de caractère cytochimique.

En effet, il signale, pour le milieu axénique, une activité enzymatique plus importante pour trois enzymes :

- Phosphatase acide,
- Estérase,
- NAD diaphorase.

LUNDE et DIAMOND, (51), en 1969, pensent que la flore microbienne associée doit modifier la structure antigénique d'E. histolytica, ce qui est jugé par ces auteurs comme un problème résolu par la culture axénique.

BENEX, (7), en 1971, se pose également la question de savoir si la flore bactérienne dans les cultures d'E. histolytica est un avantage ou un inconvénient pour la production d'antigène spécifique.

Partant du principe qu'en culture classique E. histolytica est maintenue dans un milieu se rapprochant le plus du milieu physiologique, ses caractères antigéniques doivent être les plus spécifiques.

Les bactéries sans lesquelles on ne peut concevoir la présence d'amibes dans l'intestin sont-elles sans effet sur le potentiel antigénique des souches d'E. histolytica ?

Pour répondre à cette question, BENEX étudie les caractères de sa souche en FC, HA, ID, et IE, en procédant à une saturation de ses sérums de lapins immunisés par de l'antigène bactérien.

Les résultats sont les suivants :

- en FC et HA : * sérum antiflore positif au 1/160 en FC et 1/8192 en HA, face à l'antigène amibe + bactérie.
- * sérum anti-amibes positif au 1/640 en FC et 1/512 en HA, face à l'antigène amibe + bactérie.

* sérum anti-amibes saturé en flore au
1/40 en FC et 1/512 en HA.

- en ID : face à l'antigène impur, on note :
 - * 4 bandes pour le sérum anti-amibe + flore,
 - * 3 bandes pour le sérum anti-flore,
 - * 1 bande, dite spécifique, face au sérum anti-amibes + flore saturée en antigène bactérien.
- en IE : * 5 arcs avec le sérum anti-amibes + flore,
 - * 3 arcs avec le sérum saturé en antigène bactérien.

BENEX juge ces résultats superposables en FC, diffusion en gélose et HA à ceux de THOMPSON, (1968, -83), qui utilise des antigènes de cultures pures.

Néanmoins, on peut retenir une grande sensibilité des réactions en utilisant l'antigène axénique, (une dilution en FC et HA et en ID 3 arcs dont 2 majeurs pour 1 arc). Mais on ne peut accorder beaucoup de valeur à cette comparaison, celle-ci étant pratiquée dans des conditions d'expérimentation différentes, sur des sérums différents.

COUDERT, (18), en 1968, quant à lui, compare trente sérums d'amibiens avec l'antigène classique et l'antigène axénique en IF. Il ne note pas de différence significative : au maximum un degré de dilution et, dans ces cas, c'est la réaction utilisant l'antigène produit à partir des souches axéniques qui présente le degré de dilution le plus élevé.

La flore bactérienne ne semble donc pas, pour ces auteurs, apporter une meilleure spécificité à l'antigène. Néanmoins, BENEX signale la présence, (face à l'antigène obtenu à partir de culture mixte), d'un arc de précipitation en ID pour la phase liquide du milieu, après 5 jours de culture. Il s'agit donc d'antigène pouvant provenir du produit de métabolisme des amibes et dont d'étude devrait conduire à des résultats intéressants.

L'équipe hindoue d'OM-PRAKASH, (69), ne signale également pas de différence entre deux souches, l'une axénique HK9, l'autre provenant d'une souche locale cultivée avec une bactérie du type Klebsiella, (AIIMS), ceci quant à la sensibilité et spécificité qu'ils permettent à la réaction d'H.A.

Les résultats sont les suivants :

S E R U M S	% de positivité avec	
	HK 9	AIIMS
Abcès amibien du foie	93	86
Amibiase hépatique	100	88
Amibiase intestinale	71	57
Affections non amibiennes variées	25	35
Personnes en bonne santé	0	0

De cette étude, l'on tire la conclusion suivante : l'antigène axénique permet à la réaction d'HA la plus grande sensibilité et spécificité : 25 % de positif avec HK9 pour 35 % avec AIIMS pour des sujets souffrants d'affections non microbiennes, (il s'agissait de malades souffrant de symptômes douloureux abdominaux variés ; ils n'ont pas eu de contrôle parasitologique des selles).

Mais dans ces groupes d'études, le même sérum n'a pas été testé avec les deux antigènes.

Pour un petit groupe de sujets, (38), la réaction fut pratiquée avec les deux antigènes. L'auteur note :

- des ^{taux} d'anticorps plus élevés pour l'antigène HK9,
- un cas d'amibiase hépatique positif avec HK9, négatif avec AIIMS,
- un cas d'amibiase intestinale négatif avec HK9, positif avec AIIMS.

Néanmoins, l'auteur préfère l'utilisation de la souche locale non axénique en raison de la difficulté d'obtention d'un antigène axénique commercialisé.

Utilisant le test au latex, NIEL, (66), en 1972, constate également la plus grande sensibilité de l'antigène axénique par rapport à l'antigène brut, (préparation de BENEX). Aussi, préfère-t-il utiliser l'antigène provenant de souche axénisée.

FELGNER, (30), en 1976, compare l'antigène obtenu à partir d'E. histolytica axénique, (HK9), et un antigène obtenu à partir de culture monoxénique, (Crithidia). Contrairement aux autres auteurs, il remarque des taux de dilution beaucoup plus élevés, obtenus avec l'antigène monoxénique en FC, alors qu'il ne retient pas de différence en HA. Il préfère utiliser cet antigène étant donné l'absence d'interférence dans la réaction sérologique due à Crithidia et la plus grande richesse et la plus grande facilité de pousse de la culture monoxénique.

A la lumière des travaux de ces différents auteurs, nous retiendrons qu'il est préférable d'utiliser l'antigène axénique, bien qu'il n'existe pas de différence vraiment significative entre les antigènes obtenus à partir des deux types de culture.

Ceci pour diverses raisons :

- a - la plus grande sensibilité obtenue le plus souvent avec l'antigène axénique,
- b - la purification de l'antigène obtenue à partir de culture bactérienne oblige à de longues et fastidieuses étapes de lavages, sédimentations et centrifugations. Et celles-ci, n'empêchent pas, comme le confirme MITHAL, (58), en 1978, la persistance de débris, (amidon, germes), venant gêner la lecture de la réaction d'IF.

- c - la plus grande richesse de ces cultures, un tube de culture pouvant suffire à de nombreuses réactions d'IF,
- d - la pureté et l'absence de variations antigéniques des souches axéniques promettant une standardisation de
 - la quantité d'antigène à utiliser pour la réaction,
 - l'établissement du seuil de positivité pour les différentes réactions,
 - permettre de préciser la valeur à accorder à la réaction en fonction du taux de positivité, celui-ci ne variant pas d'un lot d'antigène à l'autre.

C H A P I T R E I I I

DISCUSSION DE LA FAUSSE POSITIVITE

On parle de "faux positifs" dans le cas d'une sérologie positive, à un taux notable, chez un sujet chez lequel il est prouvé :

- l'absence d'antécédents d'amibiase,
- l'absence de manifestations et d'évolution clinique pouvant évoquer une amibiase,
- la négativité des examens parasitologiques des selles, (3 examens sur selles fraîches),
- l'absence d'amélioration clinique et biologique sous traitement anti-amibien spécifique.

Néanmoins, l'on peut se demander si ces "faux positifs" ne correspondent pas, en fait,

- à des porteurs sains, (les examens de selles n'étant pas toujours réalisables et pouvant apparaître négatifs),
- à des amibiases asymptomatiques,
- à des anticorps résiduels d'amibiase ancienne passée inaperçue. Cette hypothèse s'appuie sur le fait que les taux de "faux positifs" sont plus élevés dans les zones de forte endémie que dans les zones de faible incidence de la maladie.

1 - CAS DES PORTEURS SAINS OU AMIBIASES ASYMPTOMATIQUES

E. histolytica peut vivre en commensale chez l'homme sans induire de maladie. C'est ce que prouvent WALKER et SELLARDS, (87), en 1913, faisant ingérer à 18 volontaires des kystes d'E. histolytica pathogènes : 4 présentèrent une dysenterie amibienne et 14 devinrent des porteurs sains.

Ne créant pas de lésions de l'organisme, ces E. histolytica vivant comme commensales ne devraient pas entraîner de stimulation de l'organisme à une réponse immunitaire.

Mais il est fréquemment noté le développement d'abcès amibiens du foie en l'absence de manifestations intestinales antérieures.

Aussi peut-on conclure qu'il est impossible de dire si un sujet porteur sain n'a pas eu d'invasion tissulaire asymptomatique. De plus, WRIGHT, (91), en 1966, retient chez 5 personnes une période supérieure à 15 ans entre le moment de la contamination par E. histolytica et les manifestations cliniques d'un abcès hépatique.

Il ne peut donc pas être fait de différence entre amibiase asymptomatique et porteurs sains. Ainsi, la classification de l'ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTE ne fait-elle pas de distinction entre les deux cas et parle uniquement d'amibiase asymptomatique.

Des réactions sérologiques positives peuvent donc correspondre à des amibiases asymptomatiques.

Ainsi, MADDISON, (52), en 1965, note 35 % de réactions positives en I.D. chez des sujets présentant des examens coprologiques positifs sans signe de maladie.

MOHAPATRA, (59), en 1979, utilisant les techniques de diffusion sur gel et hémagglutination et procédant à des examens de selles chez 172 sujets asymptomatiques, découvre

40 porteurs de kystes sans signes cliniques de maladie ;
32 % d'entre eux ont une sérologie en H.A. positive, dont 4
au 1/162 et 1 au 1/486. L'auteur confirme la grande sensibi-
lité de ce test.

JUNIPER, (43), en 1972, procède à la surveillance
sérologique de 3.033 malades entrant à l'Hôpital de LITTLE
ROCK, ARKANSAS, (U. S. A.), dans un laps de temps de 9 mois.
Il utilise les réactions d'H.A., F.C., I.D..

Il note 32 réactions positives en H.A., (ce qui
représente 1,1 %, la prévalence de la maladie dans la région
considérée étant de 3,4 %). Il découvre ainsi :

- 2 amibiases symptomatiques,
- 3 amibiases asymptomatiques.

Les recherches d'E. histolytica dans les selles
des autres cas positifs furent vaines. Mais leur absence n'a
pas de valeur d'exclusion ; des traitements divers précédant
l'examen des selles, tels que : antibiotiques, purges huileuses,
baryum et usage de chloroquine, peuvent rendre cette recherche
négative.

D'autre part, des porteurs d'E. histolytica, chez
qui les examens parasitologiques des selles sont négatifs,
peuvent présenter à nouveau E. histolytica dans leurs selles
par la technique de réactivation au sulfate de magnésie.

Les avis des différents auteurs sur le retentisse-
ment sérologique des amibiases asymptomatiques sont très variés.
Pour certains la présence d'E. histolytica dans les selles
n'étant pas, en soi, une maladie, ne peut entraîner la formation
d'anticorps. Pour d'autres, le titre de la réaction est en
dessous du seuil de positivité ; pour d'autres, enfin, la
réaction peut être très positive.

Ainsi, CHARMOT, (14), en 1971, faisant une synthèse
des résultats des Ecoles Lyonnaise , Lilloise et Parisienne ,

conclut qu'il n'existe pas de formation d'anticorps dans le cas d'amibiase asymptomatique.

JEANES, (40), en 1969, trouve en I.F. que les porteurs dit sains présentent des taux d'anticorps entre $1/32$ et $1/64$, ce qui est en dessous du seuil de positivité qu'il établit à $1/64$. Les malades à amibiase asymptomatique ne présentent donc pas de réactions positives pour cet auteur.

Pour JUNIPER, en 1972, (43), les titres en hémagglutination indirecte ne permettent pas de différencier amibiase intestinale et hépatique, ni même amibiase symptomatique et asymptomatique. Mais il faut rappeler, là encore, la grande sensibilité de cette technique. Ainsi, THOMPSON, (83), en 1968, étudiant la sérologie de 19 amibiens asymptomatiques, signale 57,9 % de positifs en H.A., alors que le test de F.C. est positif dans 10 % des cas et l'I.D. négative pour tous ces sérums. Des résultats comparables étant retrouvés chez de nombreux auteurs, ces chiffres illustrent bien l'intérêt de cette réaction dans une enquête épidémiologique et sa valeur discutée dans une enquête diagnostique.

2 - CAS DES ANTICORPS RESIDUELS

D'un autre côté, il peut être considéré comme "faux positif" le sérum d'un sujet présentant des anticorps résiduels d'une amibiase ancienne connue ou passée inaperçue, ou encore oubliée si celle-ci est très ancienne.

Les auteurs constatent unanimement une différence dans la durée de persistance des anticorps résiduels en fonction de la réaction sérologique considérée.

2. 1 - En immunofluorescence

On ne signale pas de persistance d'anticorps supérieure à un an et demi.

- VERNES, 1970, (85), signale un cas d'amibiase hépatique avec négativation de la sérologie un mois et demi après traitement.

- AMBROISE-THOMAS, KIEN, 1972 : deux à six mois.
- GASTAUT, (31), huit mois à un an.
- WERY-PASKOFF, 1974, (89), et STAMM, (79), un an.
- COUDERT, (17), un an et demi.

2. 2 - En immunodiffusion et en immunoélectrophorèse

Les résultats semblent être équivalents, (SAVANNAT, -74), à ceux de l'I.F.

2. 3 - En hémagglutination

Les auteurs constatent une persistance prolongée des anticorps résiduels.

Ainsi, KRUPP et POWELL, 1971, (49), notent des positivités persistant pendant trois ans. Sachant que ces auteurs œuvrent dans des zones de forte endémie, on peut alors évoquer :

- un fort taux d'anticorps de base consécutif aux nombreuses infections et réinfections.
- une recontamination après traitement, malgré la surveillance apportée aux malades.
- la persistance d'amibes végétatives à l'état quiescent dans les tissus des sujets, entretenant ainsi une stimulation antigénique.

STAMM, quant à lui, signale des réactions sérologiques en H.A. et test au latex positives onze ans après la maladie sans qu'il existe de possibilité de recontamination. Il constate également, comme les auteurs précités, une négativation de la réaction d'I.F. en un an, (titre inférieur à 1/64). Il conclut ainsi :

- à la différence entre les anticorps hémagglutinants et fluorescents,
- à la complète corrélation entre hémagglutination et test au latex,
- à la grande valeur de l'H.A. dans une enquête épidémiologique.

Mais du fait de sa très grande sensibilité et de la persistance prolongée des anticorps après traitement, il est préférable dans un but diagnostique d'utiliser la réaction d'I.F.

JUNIPER, 1972, (43), note également des réactions sérologiques positives de six mois à trois ans avec cette réaction. Les résultats semblent identiques également en F.C. et I.D..

Donc, avant de parler de "faux positifs", il convient de bien interroger le malade à la recherche d'antécédents d'amibiase ancienne. Mais les taux d'anticorps persistants concernent le plus souvent des cas d'amibiase hépatique dont la clinique est suffisamment marquante pour être bien connue par le malade. La grande longévité des anticorps n'est retrouvée, en fait, qu'avec la réaction d'H.A., une des plus sensibles des réactions sérologiques. La durée de vie des anticorps avec les autres réactions étant relativement brève (inférieure à un an et demi).

Mais le problème reste entier pour l'amibiase asymptomatique.

3 - FREQUENCE DES CAS DE "FAUX POSITIFS" EN FONCTION DE LA REGION CONSIDEREE

De nombreux auteurs retrouvent en zone de forte endémie de forts pourcentages de "faux positifs". ELSDON-DEW les qualifie de "positifs non spécifiques" et il parle de "bruits de fond sérologiques" de ces populations particulières.

En AFRIQUE DU SUD, par exemple, MADDISON, en 1965, (52), constate de nombreuses réactions sérologiques positives inexpliquées en I.D. :

- chez des donneurs de sang sains : 1 % des Blancs
3 % des Indiens
9 % des Africains
ont une sérologie amibienne positive.
- chez les malades souffrants d'autres maladies :
6 % des Indiens et
15 % des Africains

A CALI, en COLOMBIE, KRUPP, en 1970, (47), constate dans cette zone de forte prévalence de la maladie, 7% de réactions d'H.A. anormalement positives. Les taux se situent entre 1/80 et 1/640.

De plus, il n'existerait pas toujours une correspondance entre l'indice de prévalence de la maladie et le nombre d'amibiases asymptomatiques. C'est ce que prouve MILLER, (57), dans une étude intéressante. Cet auteur examine pendant une durée de cinq ans neuf réserves indiennes "semi-isolées". L'amibiase est endémique dans les neuf communautés, (E. histolytica retrouvée dans les selles d'enfants d'âge scolaire en bonne santé). Mais seules quatre réserves recensent des cas d'amibiase-maladie. Par contre, la réaction sérologique d'H.A. se révèle positive dans cinq populations, (dont les quatre où furent rencontrées la maladie). Il n'existe pas de rapport entre le nombre de malades et le nombre de réactions sérologiques positives ; celui-ci étant beaucoup plus élevé. En effet, un lot de 24 enfants d'âge scolaire, d'une des réserves, présente 90 % de réactions positives en H.A., pour 33 % d'exams de selles positifs et 9 cas d'amibiase dans la population en 5 ans, (population de 250 à 550 habitants).

Cette étude nous sensibilise donc au fait que des "faux positifs", retrouvés dans une population où l'amibiase a une faible incidence, pourraient en fait être le résultat d'un fort taux d'infection par E. histolytica sans signe de maladie.

Une fois de plus, les test sérologiques employés semblent confirmer leur intérêt dans une enquête épidémiologique mais ont peu d'intérêt diagnostique, (H.A. et I.D.R.).

De même, dans une population de 113 sujets non amibiens provenant de régions de forte endémie, STAMM, (79), note 6 sérologies positives en H.A., (taux entre 1/160 et 1/1280), alors que toutes les I.F. se révèlent inférieures au 1/32.

Nous retenons néanmoins l'importance des examens parasitologiques des selles à pratiquer avant de parler de "faux positifs".

Quelques auteurs se sont livrés à une intéressante comparaison entre les taux de "faux positifs" dans des populations où l'incidence de la maladie est très différente.

COUDERT, en 1967, (16), alors qu'il ne constate aucun "faux positif" en I.F. chez 70 sujets non amibiens, (taux inférieur au 1/50), note trois sérologies au 1/50 et 2 au 1/100 parmi seize africains pour lesquels les examens coprologiques et cliniques ne permettent d'évoquer l'amibiase.

Par contre, JEANES, 1969, (40), comparant en I.F. 128 donneurs de sang, vivant à LONDRES, (U.K.) et 116 donneurs de sang de race noire vivant à DURBAN (AFRIQUE DU SUD), ne remarque pas de différence entre les échantillons de ces 2 populations (taux inférieurs au 1/16). Il conclut que les anticorps retrouvés chez les sujets non amibiens ne résultent pas d'anticorps résiduels d'amibiase ancienne ou d'amibiase asymptomatique.

GEORGET en 1967, (33), ne retrouve pas de taux d'anticorps en I.F. inférieurs au 1/50 chez 140 sérums de sujets sains et 60 sérums de nouveau-nés, alors qu'il constate chez 47 Européens vivant en zone d'endémie 2 titres au 1/50 et 2 au 1/100 et, chez 48 africains en bonne santé, 9 titres au 1/50 et 7 au 1/100.

Nous sommes donc amenés à conclure que, se trouvant face à une réaction sérologique anormalement positive chez un sujet apparemment sain, il est important de considérer :

- tout antécédent de maladie pouvant évoquer une amibiase ancienne en se rappelant que la durée de vie des anticorps résiduels est de l'ordre de 1 à 2 ans avec les réactions sérologiques habituelles, mais peut atteindre 10 ans avec la réaction d'H.A.
- l'examen parasitologique des selles fraîches répété plusieurs fois, voire même en utilisant des techniques de réactivation.
- l'incidence de la maladie dans la région d'origine du malade.

o

o

o

C H A P I T R E I V

AFFECTIONS NON AMIBIENNES

AUXQUELLES PEUVENT CORRESPONDRE

LES "FAUX POSITIFS"

Notre but étant d'essayer de trouver une explication aux "faux positifs" dans les réactions sérologiques de l'amibiase :

- nous avons donc, dans un premier temps, considéré les problèmes de spécificité et de sensibilité liés aux principales réactions sérologiques.
- nous nous sommes ensuite intéressés à la possibilité de "faux positifs" liés à la présence de protéines non amibiennes.
- puis, nous nous sommes rendus compte qu'une discussion s'imposait sur la notion de "faux positifs".
- enfin, rassemblant les expériences de différents auteurs, nous allons essayer de définir les affections non amibiennes auxquelles correspondent ces "faux positifs".

Comme le signale JUNIPER, 1972, (43), il n'existe pas de cas tranchés où l'on rencontre des réactions sérologiques positives pour d'autres maladies ou d'autres parasitoses. Notre but sera donc de préciser les cas où l'on rencontre des "faux positifs".

Les cas recensés peuvent être classés grossièrement en 5 catégories :

- 1 - "faux positifs" dans le cas d'autres parasitoses.
- 2 - "faux positifs" dus aux amibes commensales non pathogènes.
- 3 - "faux positifs" dans le cas d'affections gastro-intestinales.
- 4 - "faux positifs" dans le cas d'infections microbiennes.
- 5 - "faux positifs" dans le cas d'atteintes hépatiques.

1 - "FAUX POSITIFS" DANS LE CAS D'AUTRES PARASITOSES

De nombreux auteurs ont recherché l'existence de réactions croisées avec d'autres parasitoses. La spécificité antigénique a toujours été démontrée, (AHMED, 1977, par l'immunopéroxydase indirecte, -27, COUDERT, 1968, par l'immuno-fluorescence, -16)

Deux exceptions, néanmoins, ont été notées :

- a) NIEL, 1972, (66), utilisant le test au latex, note chez 52 sujets non amibiens 5 positivités anormales, dont 2 très franches pour une hydatidose et une encéphalite toxoplasmique. Mais l'auteur lui-même émet quelques critiques quant à la qualité de cette réaction, la considérant seulement comme un test de dépistage. De plus, ces positivités anormales ne sont pas retrouvées en I.F..
- b) FELGNER, 1976, (29), signale également, avec ce test, des cas de paludisme où la sérologie amibienne est transitoirement positive. Il rapporte également l'expérience de KLEY, (44), qui a remarqué des médicaments responsables d'agglutination spontanée avec le test au latex.

N'ayant pas retrouvé de "faux positifs" dans le cas d'affections parasitaires autres que l'amibiase avec d'autres réactions sérologiques que le test au latex, nous pouvons conclure à l'absence de réactions croisées.

2 - "FAUX POSITIFS" DUS AUX AMIBES COMMENSALES NON PATHOGENES

Certains auteurs ont prouvé l'existence d'une communauté antigénique entre E. histolytica et les amibes commensales du tube digestif. Ces dernières sont-elles capables de déclencher l'élaboration d'anticorps par le sujet porteur ?

Si oui, ce phénomène est susceptible d'être à l'origine de réactions faussement positives.

2. 1 - Communauté antigénique entre les diverses amibes prouvée par l'utilisation de lapins hyperimmuns

De nombreux auteurs ont effectué une étude comparative d'antigénicité entre E. histolytica et les autres amibes. Certains signalent une communauté antigénique entre ces diverses amibes d'importance variable suivant les réactions sérologiques et les souches considérées. Celle-ci sont mises en évidence grâce à des sérums hyperimmuns de lapins.

Ainsi, des études comparatives de E. histolytica et E. invadens (amibes du serpent) révèlent une parenté antigénique pour les réactions utilisant l'antigène soluble (DWYER, (26), en I.D. et I.E., ALI KHAN, MEEEROVITCH, (3), en I.D., MYJAK, (62), en H.A., KRUPP, (46), en I.E.).

De même pour les souches E. histolytica-like, cultivable à 25°, (Huff et Laredo), et E. histolytica une communauté antigénique est retrouvée avec l'antigène soluble, (KRUPP, (46), en I.E., LUNDE et DIAMOND, (51), en I.E. et H.A.).

Donc, les différents auteurs concluent dans les réactions utilisant l'antigène soluble (I.D., I.E. et H.A.) et des sérums de lapins hyperimmuns, à l'existence d'antigènes communs entre les différentes souches d'amibes :

- amibes cultivées à 37°C pathogènes,
- amibes cultivables à 25°C (E. histolytica-like et E. invadens)

2. 2 - Utilisation d'antigènes obtenus à partir d'autres amibes que *E. histolytica*

a) Pour l'antigène soluble, la communauté antigénique est également prouvée par la positivité des sérums d'amibiens dans des réactions sérologiques utilisant des antigènes solubles d'autres amibes :

- GOLDMAN, (36), entre 8 souches *E. histolytica* 5 souches *E. histolytica*-like, *E. moshkowskii* (amibes libres) et *E. coli* (utilisation d'anticorps fluorescents).
- LUNDE et DIAMOND, (51), entre *E. histolytica* et Laredo en H.A.
- YAP, (92), entre *E. histolytica* et kyste d'*E. invadens* en H.A. et I.D.

b) Pour l'antigène figuré il ne semble pas exister de réactions croisées :

- COUDERT, (16), entre *E. coli*, *E. invadens* et *E. histolytica* en I.F.
- DAS, (19), entre Laredo, Huff, *E. invadens* et *Naegleria* (amibes libres), en utilisant la technique d'agglutination de leucocytes sensibilisés.

2. 3 - Positifs inexplicables présentant des amibes non pathogènes dans leurs selles

Il est rencontré des cas où des sujets non amibiens présentent une réaction sérologique positive et chez qui les examens coprologiques révèlent l'existence d'amibes non pathogènes.

Ainsi MOLINIER, (61), utilisant l'I.F. signale 2 cas de réactions au 1/50 avec la présence à l'examen coprologique de *Dientamoeba fragilis* et dans un autre cas, une I.F. au 1/100 avec *Endolimax nana*.

SAVANAT, (74), note 7 réactions d'I.E. positives parmi 95 patients non amibiens. 2 présentent, dans les selles, E. coli, l'auteur les considère ainsi comme de vrais "faux positifs" !

VINAYAK, (86), se livre à une étude sur un groupe de singes (Macaca mulata) présentant une amibe :

- non différente morphologiquement d'E. histolytica
- n'entraînant pas de manifestations cliniques
- responsable du parasitisme de 29 % de ces singes.

Ces singes peuvent également être infectés par E. histolytica, mais ils se présentent, dans ce cas, comme porteurs asymptomatiques.

Il utilise 2 types d'antigènes :

- l'un préparé à partir de la souche axénique NIH 200,
- l'autre à partir d'amibes de Macaca mulata cultivées sur milieu de BOECK et DRBOHLAV.

Chez 23 singes présentant des kystes d'amibes dans les selles 60 % sont positifs avec NIH 200, 65 % avec l'autre antigène.

Chez 19 singes dont l'examen coprologique est négatif, 5 % sont positifs avec l'antigène NIH 200, 5 % avec l'amibe de Macaca mulata ; ceci en H.A. et étant considéré comme positif un taux supérieur au 1/128.

Nous nous permettons néanmoins de conclure que si ces amibes sont responsables chez leur hôte d'un certain taux d'anticorps décelable avec les différentes réactions sérologiques amibiennes, celui-ci est certainement faible comme le confirme MOLINIER ; ceci pour 2 raisons :

- faible importance de la communauté antigénique entre les différents types d'amibes.
- le caractère peu ou pas pathogène (on prête à certaines de ces amibes un caractère agressif, par exemple la souche Laredo) de ces amibes.

3 - "FAUX POSITIFS" DANS LE CAS D'AFFECTIONS GASTRO- INTESTINALES VARIEES

3. 1 - Symptômes gastro-intestinaux divers

Dans les pays d'hyperendémie, les parasitologues sont amenés, chez des sujets présentant des désordres gastro-intestinaux variés, à pratiquer des examens sérologiques pour l'amibiase.

Ainsi, en INDE, PRAKASH, (69) recense 25 à 35 % de "faux positifs" chez des sujets présentant des symptômes abdominaux variés. Les examens coprologiques n'ont pas été faits, mais une amibiase a été écartée chez ces sujets. Ce très fort pourcentage de positivité surprend, d'autant qu'un échantillon de sujets en bonne santé ne révèle pas de "faux positifs". Mais ce groupe est constitué, en opposition au premier, de sujets à haut niveau socio-économique. Le contact avec différents germes et parasites étant facilité par des conditions d'hygiène moindres, ceci explique le pourcentage beaucoup plus important chez ces sujets plus pauvres. Ce groupe à fort pourcentage de positivité semble donc être l'illustration de la réserve à émettre quant à la notion de "faux positifs" dans les régions d'hyperendémie. Les réactions sérologiques positives devant être là le cas d'amibiases asymptomatiques ou anciennes avec anticorps résiduels.

GOLDMAN, (35) utilisant un antigène extrait de cultures classiques, note un pourcentage de "faux positifs" identiques entre les sujets présentant des symptômes gastro-intestinaux et les sujets sains. Sur 17 personnes en bonne santé, ou souffrant de troubles digestifs, il signale 4 titres au 1/16 et 2 au 1/64.

3. 2 - Rectocolite hémorragique et maladie de CROHN

D'autres auteurs se sont préoccupés du diagnostic sérologique de l'amibiase dans une autre affection gastro-intestinale : la rectocolite hémorragique (R.C.H.).

R.C.H. et amibiase intestinale posent de difficiles problèmes de diagnostic différentiel, d'autant qu'elles peuvent être associées (NECHALI, 1978, -65). Dans ce cas, la sérologie est un examen complémentaire d'une importance capitale.

Etudiant 7 cas de R.C.H. par la réaction d'I.F. avec l'antigène extrait de culture mixte, MOLINIER, (61), arrive aux résultats suivants :

- 2 négatifs dont 1 ayant une amibiase connue,
- 1 cas au 1/50 et 1 au 1/100 chez d'anciens amibiens,
- 1 cas au 1/100 et 1 au 1/200 chez des sujets sans passé Outre-Mer, ni antécédents d'amibiase .
- 1 cas au 1/800 où une amibiase tissulaire fut prouvée.

De même, cet auteur signale 1 cas de maladie de CROHN avec un taux de 1/50 en I.F.

4 - "FAUX POSITIFS" DANS LE CAS D'INFECTIONS MICROBIENNES

L'on peut se demander si l'antigène impur obtenu à partir de culture associant à E. histolytica la flore intestinale ne peut être à l'origine de "faux positifs" dans le cas d'infections microbiennes.

Dans le cas de dysenterie bacillaire ou d'abcès microbien, par exemple, l'individu produisant des anticorps contre les éléments microbiens.

Ainsi, MADDISON, (52), utilisant la réaction d'I.D. et un antigène produit à partir de culture d'E. histolytica associée à C. welchii ou E. coli et A. anaérogènes, signale dans le cas de dysenterie bacillaire :

- 73 % de cas de sujets présentant l'arc C. welchii
- 27 % de sérologie amibienne positive alors que dans la même population seulement 1 à 3 % de sujets sains présentent une réaction positive (Africains et Hindous)

JOURNE, en 1978, (42), note 3 examens successifs en I.F. à des titres élevés au 1/100, 1/200, 1/800. Les réactions d'H.A., test au latex et ELISA étaient négatifs chez ce malade. Le diagnostic d'amibiase fut écarté, un abcès bactérien de la queue du pancréas fut confirmé.

De même, DEKOWNINCK, (21), étudiant en I.F. 52 sujets atteints de septicémie, retient 6 sérologies positives au 1/50 et 2 au 1/200 ; un taux élevé au 1/600 est constaté pour une septicémie à Klebsiella.

Dans tous ces cas, l'antigène utilisé était polyxénique. En I.F., la présence d'anticorps antimicrobiens est confirmée par certains auteurs qui remarquent la fluorescence de la flore associée à l'antigène figuré.

AMBROISE-THOMAS, (4), rendait les germes présents à la surface de l'amibe ou phagocytés par elle, responsables de positivité à des taux de dilution faible (1/50).

Peut-on rendre la flore bactérienne associée à l'antigène figuré responsable des "faux positifs" précités?

Malheureusement, ces auteurs n'ont pas fait de comparaison entre antigène axénique et polyxénique.

5 - "FAUX POSITIFS" DANS LE CAS D'ATTEINTES HEPATIQUES

C'est dans le cas d'atteintes hépatiques que l'on retient le plus de cas de "faux positifs". Ceux-ci furent découverts grâce à la réaction d'I.F. dont les auteurs s'accordent à admettre la grande spécificité.

5. 1 - Cirrhose ascitique

MOLINIER, (61), signale des taux élevés d'anticorps dans cette maladie. Sur 5 cas étudiés, les titres de dilution retrouvés sont les suivants : 2 au 1/400, 1 au 1/200, 1 au 1/100 et 1 négatif.

Dans tous les cas, le diagnostic d'amibiase est formellement rejeté.

JOURNE, (42), retient sur un lot de 10 cirrhotiques 2 positivités au 1/100 et 1/200. En hémagglutination, la réaction était positive au 1/256 dans les deux cas. De plus, le malade présentant le taux de 1/200 en I.F. avait un test au latex positif. Un autre cirrhotique avait une H.A. au 1/128 (l'I.F. était dans ce cas négative).

DEKOWNINCK, (21), note également dans une hémochromatose un taux en I.F. au 1/800.

5. 2 - Cancer secondaire du foie

GENTILINI et NIEL, (32), ainsi que JEANES, (40), signalent de rares cas de positivité à des taux notables au cours de certaines néoplasies avec métastases hépatiques. Ainsi, JEANES, sur 270 malades non amibiens, retient 2 sujets avec des taux au 1/32.; il s'agit d'un carcinome du caecum et d'un cancer du sein métastasé au foie. Mais cet auteur ne considère pas ces cas comme des "faux positifs", un taux significatif étant pour lui supérieur ou égal au 1/64. De même, il ne note pas de "faux positifs" chez 58 sujets atteints d'affections hépatiques non amibiennes.

Par contre, BOMPART, 1976, (8), rapporte l'observation d'un cancer du foie secondaire à un adénocarcinome du sigmoïde sans antécédents d'amibiase avec une réaction d'I.F. positive au 1/640 et douteuse au 1/1280. Ce taux est retrouvé à deux reprises à deux jours d'intervalle par deux laboratoires différents.

Un traitement systématique au metronidazole ne modifie pas l'évolution ni clinique, ni biologique. A la nécropsie, la recherche d'un foyer amibien reste négative.

NOZAIS, 1979, (68), en zone d'endémie, (COTE D'IVOIRE), ne rencontre pas de sérologie positive en I.F. chez les sujets sains. Par contre, il signale, pour deux cas de cancers primitifs du foie sur 9 étudiés et pour les deux cancers secondaires étudiés, des taux significatifs au 1/160. Cet auteur retient donc des titres élevés chez des sujets non amibiens présentant une pathologie hépatique :

	0	1/80	1/160	1/320	1/640	%
7 cirrhoses	4	0	1	1	1	26 %
11 cancers I	4	3	1	0	1	
II	0	0	1	0	1	
13 hépatiques	12	0	0	0	1	9 %
14 témoins intestinaux	10	2	0	0	2	
23 témoins non hépatiques	19	1	1	1	1	
17 témoins sains	15	2	0	0	0	

Cet auteur nous éveille ainsi à la prudence dont il faut faire preuve dans l'interprétation de la réaction sérologique d'I.F. dans le cas d'atteinte hépatique, de nombreux "faux positifs" à des taux très significatifs pouvant se rencontrer.

Un doute subsiste, l'étude ayant été faite dans une zone de forte endémie, bien que 17 témoins sains soient négatifs et sur 23 malades non hépatiques et non amibiens, seuls 3% aient une sérologie supérieure au 1/160.

D'un autre côté dans une zone où l'amibiase a une faible incidence, (sud de la FRANCE), GASTAUT, (31), ne signale pas de "faux positifs", (taux inférieur au 1/50), chez 75 malades hépatiques (cancer, cirrhose, hépatite).

Par contre, deux cas de parasitoses hépatiques, (1 hydatidose et 1 distomatose) révèlent une sérologie faiblement positive au 1/50.

Avec la réaction d'hémagglutination, 12 % des sujets atteints d'affections hépatiques non parasitaires sont positifs et 16 % des personnes atteintes de parasitoses diverses.

C'est également dans une zone de faible prévalence de l'amibiase, (HOLLANDE), que LAARMAN, 1975, (50), ne trouve aucune réaction positive chez 100 donneurs de sang (taux tous inférieurs au 1/10) et retient chez 94 sujets présentant des taux de transminases élevés, 19 réactions positives :

- 14 sérums sont positifs en I.F. au taux de 1/20,
- 4 au 1/40,
- 1 au 1/80.

6 - CONCLUSIONS

6. 1 - Dans l'ensemble des "faux positifs" recensés, la technique sérologique utilisée est l'I.F., les autres cas de "faux positifs" obtenus avec d'autres réactions sérologiques étant mis sur le compte de la technique elle-même (test au latex, agglutination). Mais les rares cas où l'I.F. est couplée à d'autres réactions, (H.A.), celles-ci se révèlent également positives.

De plus, l'antigène est obtenu le plus souvent à partir de cultures classiques associant une flore bactérienne variée. (Nous ne connaissons pas la nature de l'antigène utilisé par l'équipe travaillant en collaboration avec BOMPART). Les différents auteurs ne semblent pas impliquer cet antigène comme responsable.

Néanmoins, deux exceptions à signaler :

- MADDISON, (52), évoque la responsabilité de l'antigène dans le cas de dysenterie bacillaire avec taux d'anticorps anti-amibiens en proportion élevée. Mais, pour elle, cela correspond peut-être à des facteurs épidémiologiques identiques aux deux maladies, ainsi ces malades ont pu présenter antérieurement une dysenterie amibienne.
- PRAKASH, (69), note un pourcentage plus important (35 %) de "faux positifs" avec l'antigène classique contre 25 % avec l'antigène axénique.; Ceci chez des sujets présentant des troubles intestinaux variés. Cette différence est accentuée par le fait que, dans cette étude, PRAKASH prouve la plus grande sensibilité de l'antigène axénique dans le cas d'amibiase confirmée.

On retient donc, dans le cas d'atteintes hépatiques diverses, des titres de dilution plus élevés que chez les sujets sains, ce qui pousse les différents chercheurs à élever le seuil de positivité de la réaction d'I.F.

Ainsi, les divers auteurs sont amenés à considérer comme significatif d'atteintes amibiennes des sérums dont le titre d'anticorps anti-amibiens est supérieur à :

- pour JEANES, 1969, (40) : 1/64, alors que les taux compris entre 1/32 et 1/64 correspondent à des porteurs sains d'E. histolytica ou à des sujets présentant des affections hépatiques.

- pour LAARMAN, (50), : 1/80.
- pour GENTILINI, 1972, (32) : 1/50.
- pour CAPRON, (12), : 1/100, 16 % de positifs étant retenus au 1/50 pour seulement 2,8 % au 1/100 (sujets venant de zones d'endémie).
- pour MOLINIER, (51) : les taux entre :
 - 1/50, 1/100 sont les témoins d'anticorps résiduels,
 - 1/200 évoque une forte présomption d'évolutivité,
 - 1/400 témoin certain d'évolutivité.
- pour COUDERT, (17), : 1/50, les titres entre 1/50 et 1/200 en I.F. devant être interprétés en connaissance des données cliniques et épidémiologiques.
- pour WERY-PASKOFF, 1974, (89) : 1/100.

Ce relèvement de seuil laisse persister cependant quelques cas de "faux positifs" à des taux très élevés.

6. 2 - Plusieurs hypothèses furent émises quant à la cause de ces "faux positifs" :

1ère hypothèse : GOLDMAN, 1966, (35), évoque l'existence de composants non globuliniques du sérum pouvant se fixer non spécifiquement sur les amibes et ayant une activité contre les antiglobulines fluorescentes de la réaction. Les protéines seraient donc responsables de "faux positifs" dans la réaction d'I.F. indirecte.

Notant 5 "faux positifs" sur 16 témoins à des taux bas, (1/64) cet auteur fit des tentatives d'absorption de ces éventuelles protéines, en particulier par les globules rouges de mouton. Aucune différence marquée n'est à **noter**.

2ème hypothèse : MOLINIER, (61), évoque un arrangement particulier de molécules globuliniques. Cet auteur note sans autre commentaire que ces nombreux cirrhotiques à titres d'anticorps anti-amibiens élevés présentent tous

une hypergammaglobulinémie et, à l'immunoélectrophorèse une augmentation des immunoglobulines G et A. D'autres auteurs, (SHER, (78), MADDISON, (55), ABIOYE, (1)) ont également montré que l'activité anti-amibienne était essentiellement en rapport avec les immunoglobulines G.

3ème hypothèse : l'hypothèse d'une protéine circulante anormale, comportant une configuration structurale proche de celle de l'antigène amibien, est évoquée par BOMPART, (8) et NOZAIS, (68). Par exemple, l'antigène carcino-embryonnaire qui est retrouvé dans certaines cirrhoses, lors de poussées de R.C.H. et néoplasmes coliques ; ces 3 types d'affections ayant curieusement des I.F. faussement positives.

4ème hypothèse : l'hypothèse déjà soulevée de "faux positifs" liés à l'utilisation de cultures mixtes, (amibes - bactéries), n'étant pas à rejeter, la plupart des "faux positifs" ci-dessus cités se rencontrant avec des réactions d'I.F. usant d'antigènes mixtes.

5ème hypothèse : l'existence d'anticorps anticellules hépatiques a été prouvée dans le cas d'amibiase hépatique ainsi que celle d'anticorps anticolon dans le cas d'amibiase intestinale (FAUBERT, 1978, -28).

L'on peut se demander si chez les sujets hépatiques faussement positifs, il n'existerait pas de tels anticorps intervenant dans la réaction sérologique. Mais FAUBERT ne constate pas de modification de la réaction d'H.A. chez les amibiens hépatiques après saturation des sérums par des hépatocytes.

o

o

o

C O N C L U S I O N S

Essayer de résoudre le problème des "faux positifs" nous amène à considérer le problème :

1 - Du choix de la technique sérologique

Afin d'éliminer des réactions faussement positives, il nous faut mettre au point des techniques offrant une meilleure spécificité et établir un seuil de positivité; Ce qui nous incite à mettre en œuvre conjointement au moins deux techniques sérologiques, l'une explorant globalement les anticorps anti-amibes, l'autre plus analytique nous permettant d'identifier le ou les systèmes AG-AC spécifiques. Les résultats de cette combinaison fourniront de meilleurs arguments diagnostiques.

2 - Du choix de l'antigène

L'antigène axénique est le meilleur. Il permet de réduire au minimum les causes d'erreurs liées au milieu et aux organismes associés et d'obtenir des lots d'antigènes de qualités identiques, permettant ainsi, à partir d'une technique sérologique, de standardiser les réactions.

Quant à l'antigène mixte, son emploi est beaucoup plus délicat du fait du grand nombre de réactions non spécifiques qu'il révèle, mais il peut cependant être utilisé. Il faut s'attacher alors à :

- obtenir une pureté maximale de l'antigène par des lavages soigneux,
- choisir des réactions utilisant l'antigène figuré en sachant que le seuil de positivité est plus élevé, ou encore des réactions analytiques permettant de faire la part des résultats liés aux fractions non spécifiques.

- étudier chaque sérum parallèlement avec l'antigène amibe et l'antigène milieu ou saturer le sérum par l'antigène milieu.

3 - De plus, avant de parler de faux positifs, il faut s'assurer, ce qui n'est pas toujours possible, qu'il ne s'agit pas d'une amibiase asymptomatique ou ancienne avec anticorps résiduels.

4 - Malgré la grande valeur des techniques et des antigènes utilisés, des réactions faussement positives semblent exister pour diverses affections ; un travail personnel va nous permettre de les mieux définir.

o

o

o

DEUXIEME PARTIE

TRAVAUX PERSONNELS

Deux buts à ces travaux :

- 1 - Comparer différents types d'antigènes tant axéniques que polybactériens

Nous avons ainsi comparé 3 souches axéniques HK9, NIH 200 et AS, une des souches la plus utilisée en FRANCE, que nous avons cultivée axéniquement.

Nous allons confronter l'antigène obtenu à partir de ces souches axéniques à l'antigène obtenu à partir de la souche A.S. cultivée sur milieu classique associé à la flore bactérienne.

Nous allons essayer de voir si une fraction particulière de ces antigènes explique les réactions faussement positives.

- 2 - D'un autre côté, nous tenterons de trouver des malades non amibiens dont le sérum se révèle faussement positif.

o o
o

1 - M A T E R I E L S

1.1 - ANTIGENES

1.1.1 - Souches

Trois souches ont été employées dans cette étude :

- HK 9 : isolée des selles d'un coréen en 1951, axénisée en 1968 par DIAMOND, (24).
- NIH 200 : isolée d'un patient à WASHINGTON, en 1949, axénisée par DIAMOND.
- AS : isolée en 1954, à LYON, des selles d'un légionnaire de retour d'INDOCHINE, axénisée en 1979 par MOLET B., (Institut de Parasitologie de STRASBOURG)

1.1.2 - Cultures

Ces trois souches sont cultivées axéniquement sur le milieu TYI S33, mis au point par DIAMOND et coll, en 1978, (25). Ce milieu a été préféré au milieu TPSI, mis au point par DIAMOND en 1968, du fait de l'impossibilité inexplicquée de cultiver la souche AS en TPSI. Par contre, les souches HK 9 et NIH 200 poussent indifféremment sur ces deux milieux.

De plus, on a utilisé la souche AS sur son milieu de culture habituel, (milieu de DOBELL et LAIDLAW). Un lot unique de sérum de cheval fut utilisé pour la confection de ce milieu, dans le but d'homogénéité des résultats.

Un examen bactériologique direct, (1), révèle la présence de cocci gram + et de bacilles gram - et + dans la culture. L'isolement de ces germes permet de retenir que la flore bactérienne, associée à E. histolytica, est constituée par :

(1) Nous remercions particulièrement le Service de Bactériologie du Médecin en Chef BIHAN-FAOU (Hôpital Régional des Armées Lyautey) et le Pharmacien Aspirant BRUGEROLLES G.

- Pseudomonas, du groupe putida
- Escherischia coli
- Microcoque.

1.1.3 - Préparation des Antigènes

Les amibes, dans leur milieu de culture, sont centrifugées à 1 500 tours/minute, pendant 10 minutes environ. On procède ensuite à un double lavage du culot, soit à l'eau physiologique, (pour l'Antigène figuré), soit au saccharose 0,25 M, (pour l'Antigène soluble).

Cette étape ne présente aucun problème technique dans le cas de culture axénique.

Pour la souche AS cultivée en milieu classique, associée à la flore bactérienne, cette phase est plus délicate :

une centrifugation lente, (1000 tours/minute), nous permet d'éliminer la phase liquide du milieu et de récupérer un culot contenant amibes et amidon. Puis, après redilution du culot dans de l'eau physiologique, nous laissons sédimenter, ne récupérant que le surnageant. Celui-ci est centrifugé et lavé à l'eau physiologique à deux reprises, afin de diminuer la quantité de germes restants. Le culot de sédimentation est réutilisé à deux reprises dans le but de séparer le maximum d'amibes de l'amidon.

On obtient ainsi deux lots distincts d'antigènes. Un produit du surnageant de la sédimentation contenant peu d'amidon, qui sera préféré pour l'immunofluorescence, l'autre plus riche en amidon sera à l'origine de l'Antigène soluble.

L'antigène figuré : est confectionné de la façon suivante :

La suspension d'amibes, ajustée à environ 40 amibes par champ, (objectif 40), est disposée à l'aide d'une pipette calibrée dans les spots de lames préalablement siliconées à 8 spots. Ces lames sont séchées à l'étuve à 37° C.

puis conservées au congélateur à - 20°C.

L'antigène soluble : est confectionné à partir des derniers culots de centrifugation repris à l'eau distillée et conservé au congélateur. Après trois congélations, broyage au mortier, décongélation, l'antigène est extrait sous agitation magnétique à 4°C pendant douze heures, suivi d'une centrifugation à 10000 tours/minute pendant vingt minutes. Le surnageant est mis à dialyser contre de l'eau distillée pendant 48 heures puis lyophilisé.

2 antigènes milieu : ont été fabriqués selon les mêmes procédés : - l'un à partir du milieu TYI S33,

- et l'autre à partir du milieu de DOBELL et LAIDLAW ensemencé avec la flore associée à la souche AS incubée quatre jours.

1.2. - SERUMS :

1.2.1 - Sérums de lapins

Six lapins "Fauve de Bourgogne" de trois kilogrammes sont immunisés par six antigènes différents, à savoir :

- Antigène NIH 200 (NIH 200)
- Antigène HK9 (HK9)
- Antigène AS axénique (AS)
- AS en culture classique avec bactéries (ASb)
- Milieu TYI S33 (TYI)
- Milieu de DOBELL et LAIDLAW (bact)

1. 2. 2 - Sérums humains

Ont été étudiés à l'aide des différents antigènes

- 10 sérums d'amibiens connus,
- 30 sérums de sujets non amibiens susceptibles de "faux positifs" (affections hépatiques diverses),
- 10 sérums de sujets en bonne santé.

2 - M E T H O D O L O G I E

2. 1 - Immunisation des lapins

Immunisation par injections intradermiques selon la méthode de VAITUKAITIS et coll. (84).

Cette méthode offre l'avantage de consommer une très faible quantité d'antigène par rapport aux méthodes d'immunisations habituelles. Une première saignée des lapins nous a permis de constater l'absence d'anticorps naturels vis-à-vis des antigènes.

Nous avons procédé à une trentaine d'injections intradermiques d'antigènes sur les lombes rasées des lapins; l'antigène est administré sous forme d'émulsion :

- 200 μ g d'antigène,
- 1 ml d'eau physiologique,
- 1 ml d'adjuvant de FREUND complet.

Un rappel est fait à la quatrième semaine, en utilisant, cette fois, de l'adjuvant de FREUND incomplet. En même temps que la première série d'injections, on administre 0,5 ml de vaccin anticoquelucheux adsorbé, (contenant 2,5 milliards de Bordetella pertussis tués*).

L'immunisation a été contrôlée par des prélèvements hebdomadaires de sang, faits à la veine marginale de l'oreille, à l'aide d'une trompe à vide. Après séparation, les sérums sont conservés à - 20°C. Dans nos travaux, seuls les sérums de la neuvième et dixième semaine, (S9 et S10), sont utilisés.

*Perthydral - Institut Pasteur.

2. 2 - Techniques sérologiques

2. 2. 1 - Réaction d'immunofluorescence indirecte

La technique employée est celle décrite par AMBROISE-THOMAS en 1969, (4). On utilise un sérum de chèvre antiglobulines humaines marqué à l'isothiocyanate de fluoresceïne (Institut Pasteur).

2. 2. 2 - Réaction d'immunoprécipitation en couche mince d'agarose

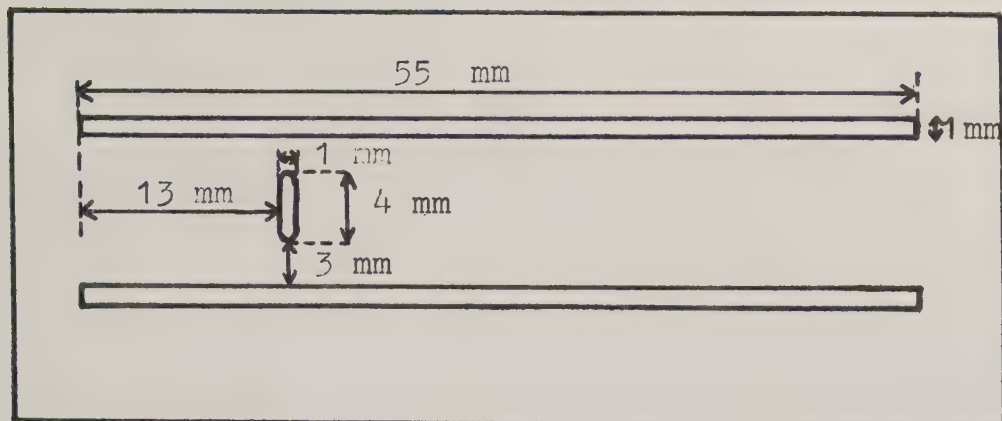
Le protocole que nous avons utilisé est dérivé de l'immunoélectrophorèse décrite par LUNDE et DIAMOND, (51). Nous l'avons adapté en fonction du redresseur immunoélectrophorétique et du matériel que nous avons à notre disposition.

Cette immunoprécipitation en couche mince d'agarose est attrayante par différents aspects :

- faible consommation d'antigène soluble : par puits en immunoélectrophorèse, nous avons déposé 500 microgrammes en moyenne.
- utilisation d'une couche mince d'agarose : nous avons coulé 5,5 ml d'Indubiose* à 1 % par lame de verre de 110 mm x 50 mm x 2 mm et 15 ml pour une lame de 150 mm x 100 mm x 2 mm.
- rapidité : la migration de l'antigène dure en moyenne deux heures trente minutes sous 2 volts par centimètre,
 - citratage une heure trente au minimum
 - trois lavages à douze heures d'intervalle.

Au cours de ces études, nous avons utilisé en I.E. la matrice suivante :

* Industrie biologique française.



Matrice utilisée pour les I.E. en couche mince d'agarose :

- rigole de sérum : 55 mm x 1 mm
- puits d'antigène : 4 mm x 1 mm
- puits d'antigène distant de 3 mm de la rigole et à 13 mm de l'extrémité cathodique de la rigole.

La capacité des puits est ainsi de 5 μ l. Des essais préalables à différentes dilutions d'antigènes nous ont permis de retenir comme offrant les résultats optima les concentrations de :

- 500 μ g dans 5 μ l de tampon véronal sodique pour les antigènes NIH 200, HK9, As et Asb.
- 250 μ g dans 5 μ l de tampon véronal sodique pour les antigènes TYI et Bact.

2. 3 - Saturation des sérums par l'antigène milieu

Le but de cette manipulation est d'essayer d'enlever les anticorps non spécifiques d'E. histolytica contenus dans les immuns sérums.

La fabrication de nos antigènes ne nous permettant pas d'éliminer totalement les éléments du milieu de culture, l'absorption par l'antigène milieu supprime les anticorps lui correspondant. Par ce moyen, on retire des réactions les précipités dus aux impuretés de nos antigènes.

Des quantités croissantes d'extraits de ce milieu de culture homologues sont ajoutées au sérum. Après incubation à 37°C pendant 2 heures, puis à + 4°C pendant 12 heures, le sérum est centrifugé à 2 500 tours/mn pendant 10 mn. Le surnageant est utilisé pour la suite de la réaction.

3 - RESULTATS AVEC SERUMS DE LAPINS HYPERIMMUNS

Dans le but de vérifier la qualité des antigènes, nous avons immunisé des lapins et étudié leurs sérums vis-à-vis des différents antigènes grâce aux réactions d'I.F. et I.E.

3. 1 - En_I.F.

Les réactions homologues et hétérologues ont été systématiquement réalisées et sont rapportées dans le tableau suivant :

Antigènes S 9	NIH 200	HK9	AS	ASb
Anti NIH 200	160	320 f	320	640 f
Anti HK9	320	160	160	160
Anti AS	320	320	320	320
Anti ASb	40 f	40 f	-	160 f
Anti TYI	160 f	160 f	320	N.P.
Anti bact.	N.P.	N.P.	N.P.	320

Légende : N.P. = non pratiqué - f = faible

- Nous sommes frappés par le faible taux d'anticorps fluorescents avec un maximum au 1/640.
- Les 4 antigènes donnent des résultats équivalents (différence au maximum de une dilution).
- Le sérum de lapin immunisé par l'antigène ASb révèle une activité fluorescente très faible, ainsi que l'avait déjà signalé COUDERT et Coll. (18)
- Les sérums de lapins immunisés par les antigènes mi-lieux montrent des taux d'anticorps fluorescents anti-amibes pratiquement aussi élevés que les sérums homologues. A la lecture nous n'avons détecté aucune différence suivant l'origine des sérums.

3. 2 - En immunoélectrophorèse

Deux buts à cette étude :

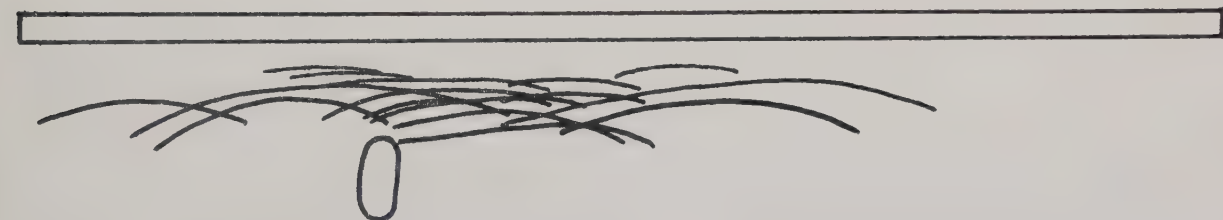
- comparer la valeur des différents antigènes utilisés.
- déterminer le rôle joué par les fractions milieux présentes dans l'antigène amibien.

3. 2. 1 - Valeurs des différents antigènes

Ces antigènes étant injectés à des lapins, les résultats obtenus sont également fonction de la compétence immunologique de ces animaux.

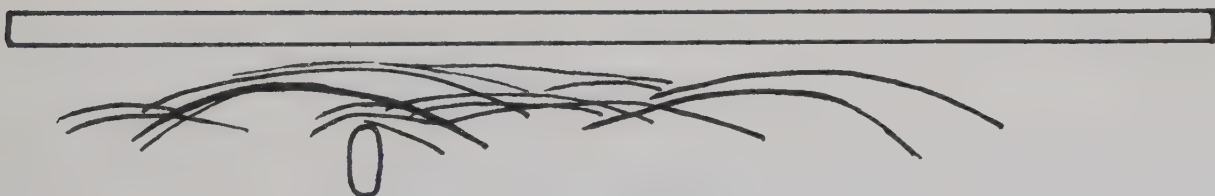
Cependant l'on peut faire les constatations suivantes :

- l'antigène NIH 200 révèle 16 fractions antigéniques vis-à-vis du sérum homologue :



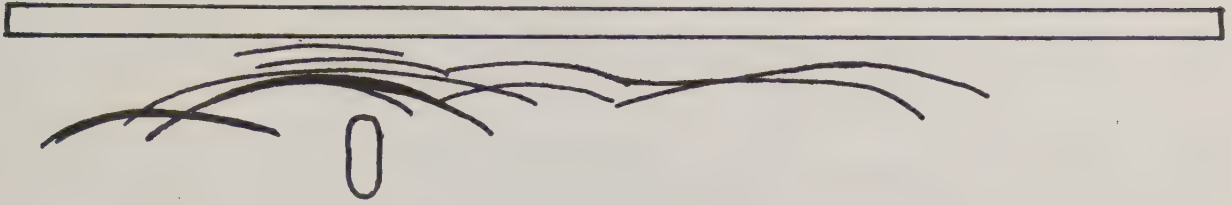
NIH 200

- l'antigène HK9 : 15 fractions :



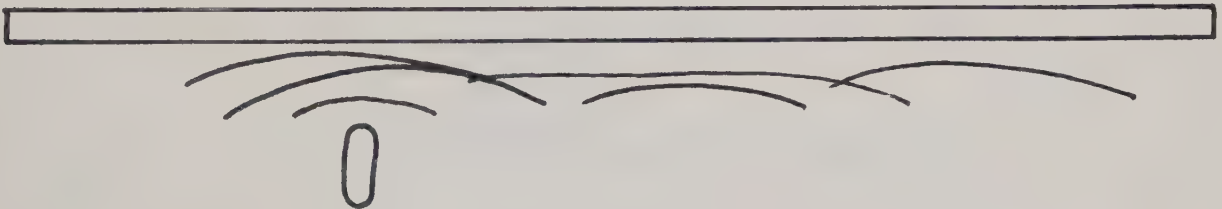
HK 9

- l'antigène AS : 10 fractions



AS

- l'antigène ASb : 6 fractions

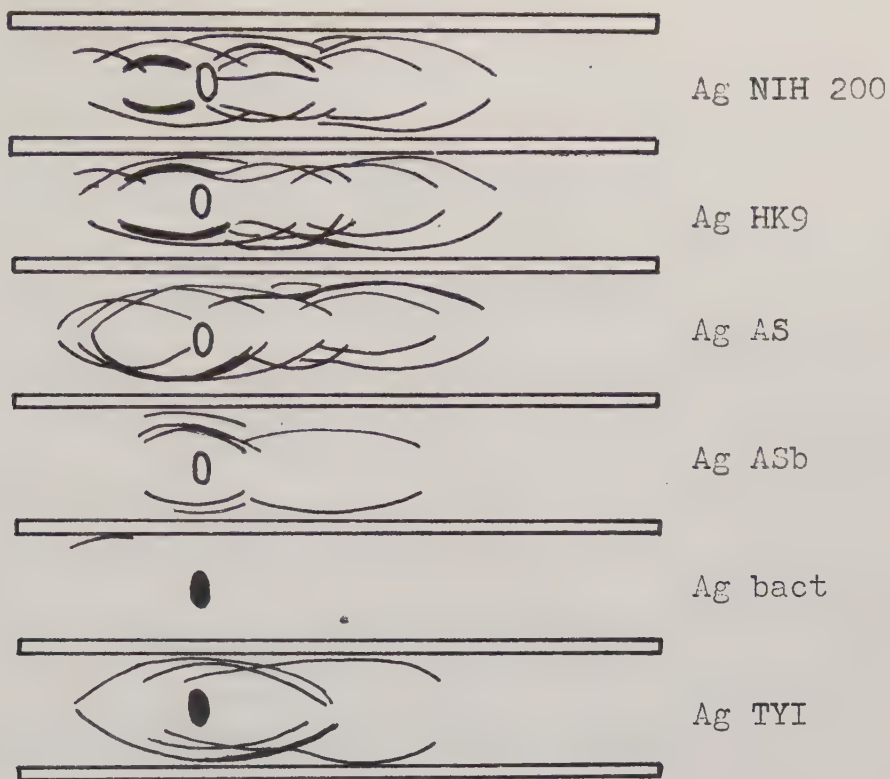


ASb

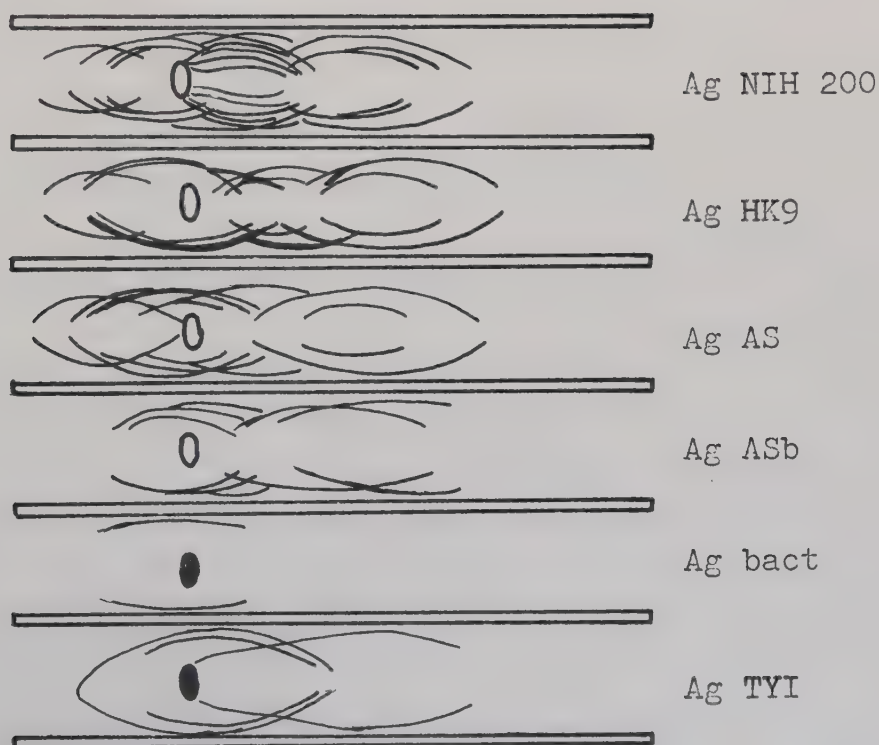
- les réactions des antigènes face aux sérums hétérologues ont été résumées dans les tableaux I et II. Les points les plus importants à noter sont :
 - la bonne qualité de l'antigène NIH 200.
 - par contre, l'antigène ASb est de mauvaise qualité : vis-à-vis de son sérum homologue 6 arcs faibles sont observés et face aux sérums hétérologues, seules 2 à 3 fractions sont révélées.
- l'antigène AS se révèle de moins bonne qualité que les autres antigènes axéniques mais il reste néanmoins très valable (7 à 9 arcs vis-à-vis des différents sérums).

TABLEAU I

SERUM HK9 (S9)

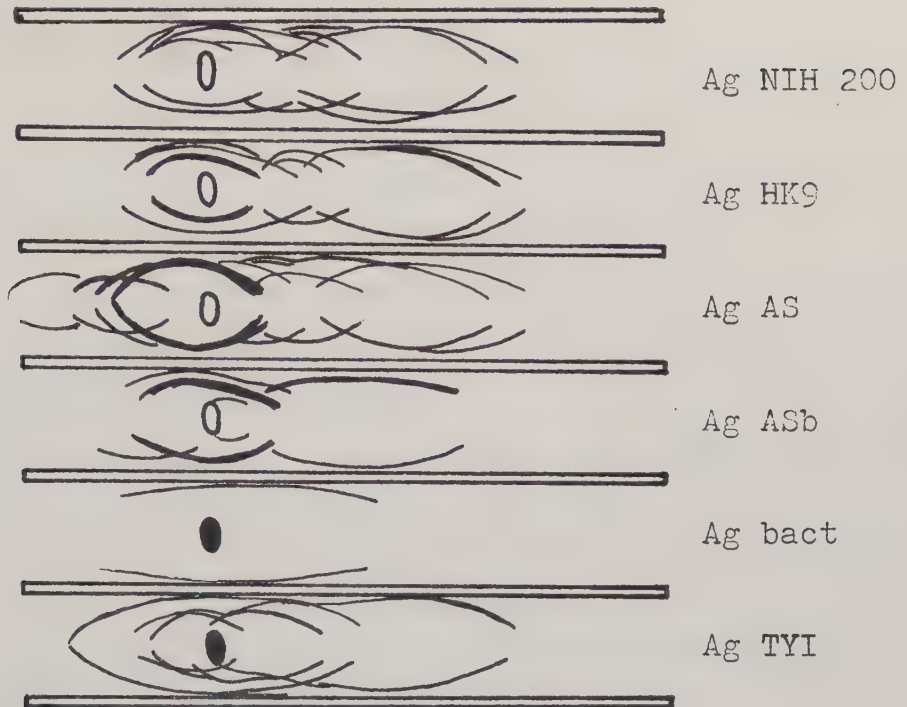


SERUM NIH 200 (S9)

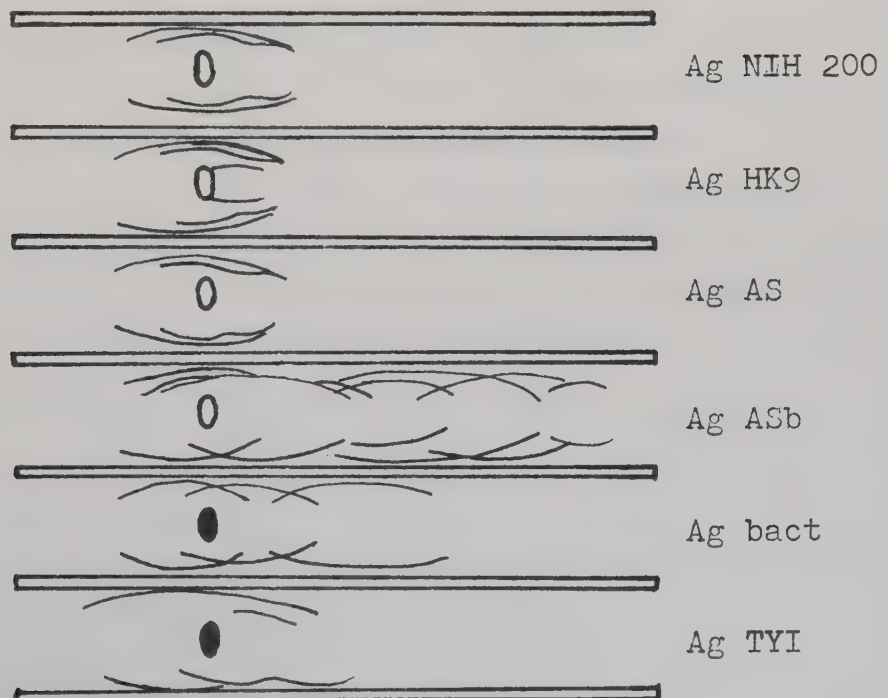


TABLÉAU II

SÉRUM AS (S9)



SÉRUM ASb (S9)



- l'antigène HK9, très valable, n'appelle aucun commentaire.

3. 2. 2 - Rôle joué par les fractions milieux présentes dans l'antigène amibe

Pour étudier l'immunogénicité nous avons immunisé des lapins contre les antigènes milieux. (Tableau III).

Les sérums anti-milieux en réaction face aux antigènes amibes correspondants révèlent 3 fractions; démontrant ainsi la grande pureté de nos antigènes.

Pour caractériser ces arcs et les situer sur l'électrophorégramme nous avons utilisé 2 techniques :

- La saturation des sérums par l'antigène milieu correspondant.
- La technique de raccordement des arcs.

(Tableau IV et V).

a) Technique de saturation des sérums par l'antigène milieu correspondant

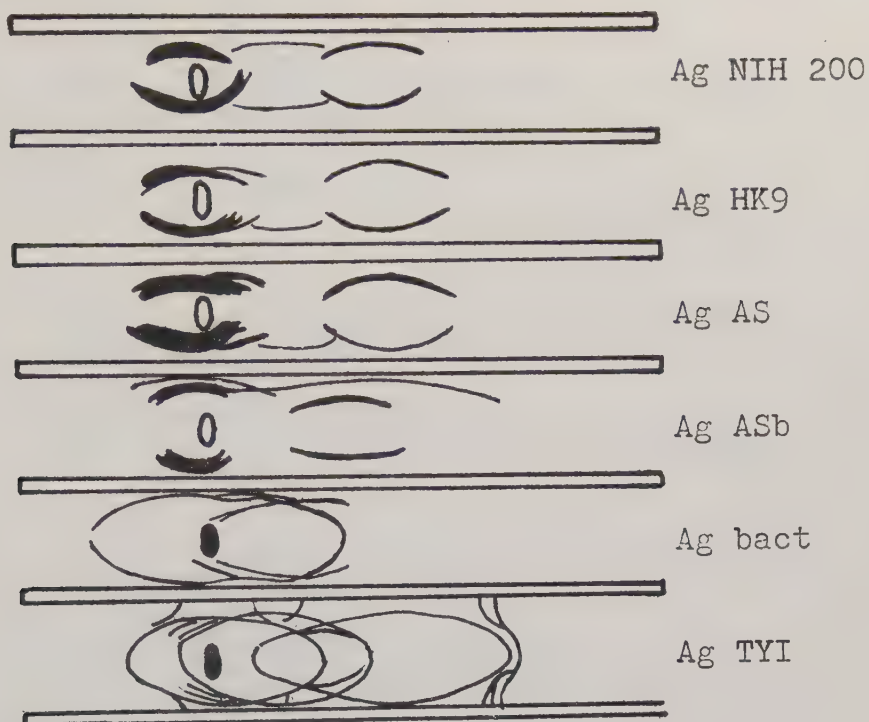
Chaque sérum hyperimmun est passé contre l'antigène amibe et l'antigène milieu homologue. (tableau IV et V, les puits de couleur noire sont, dans l'ensemble des travaux, ceux contenant des antigènes milieux).

Face à l'antigène milieu on retrouve pour le sérum témoin les 3 fractions autour du puits précédemment décrites. 1 seul arc est retrouvé avec l'antigène bactérie.

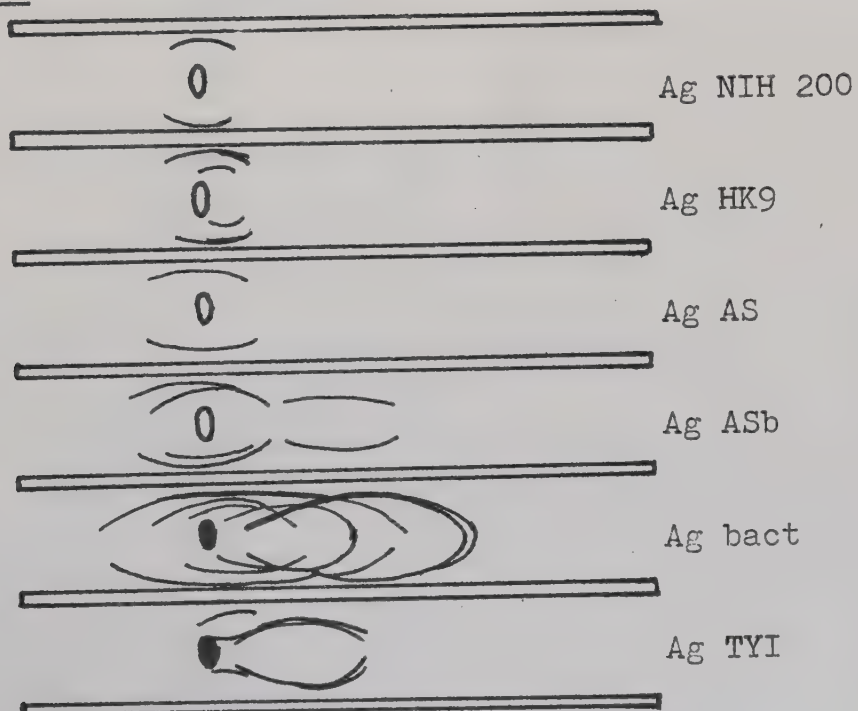
La saturation des sérums par une concentration croissante d'antigène milieu entraîne la disparition des arcs lui correspondant. Il ne persiste ainsi, comme le témoigne l'absence de réaction des sérums saturés face à l'antigène milieu, que les arcs spécifiques de l'amibe.

TABLEAU III

SERUM ANTI-TYI

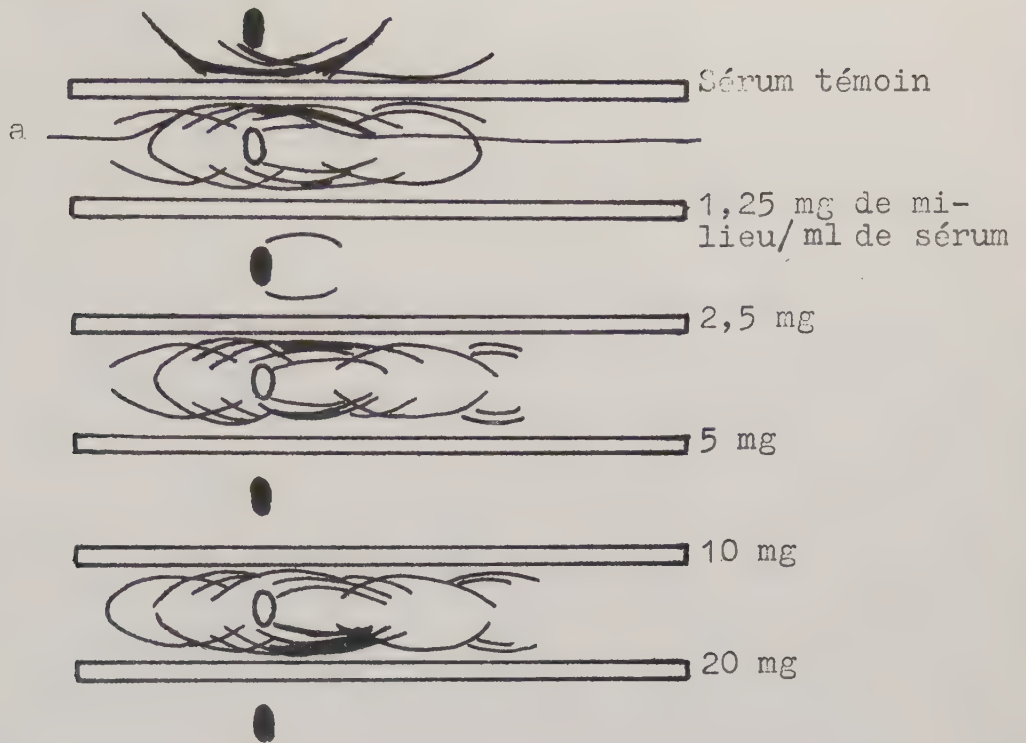


SERUM ANTI-BACT

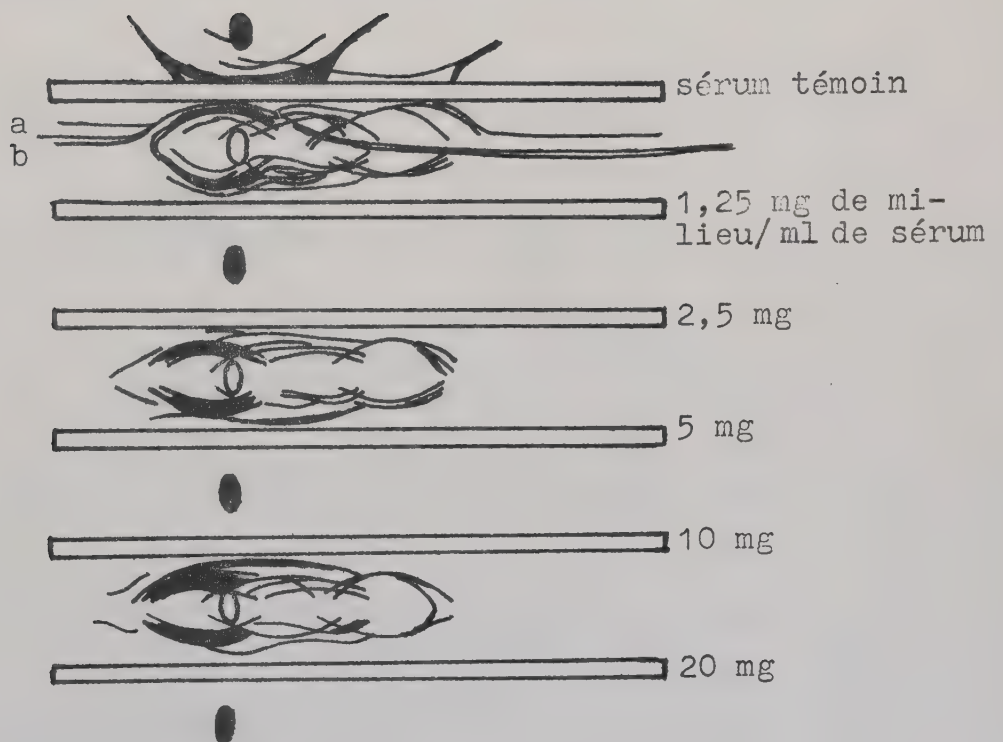


SATURATION EN MILIEU (Ag TYI) ; sérum homologue

- Ag_NIH_200

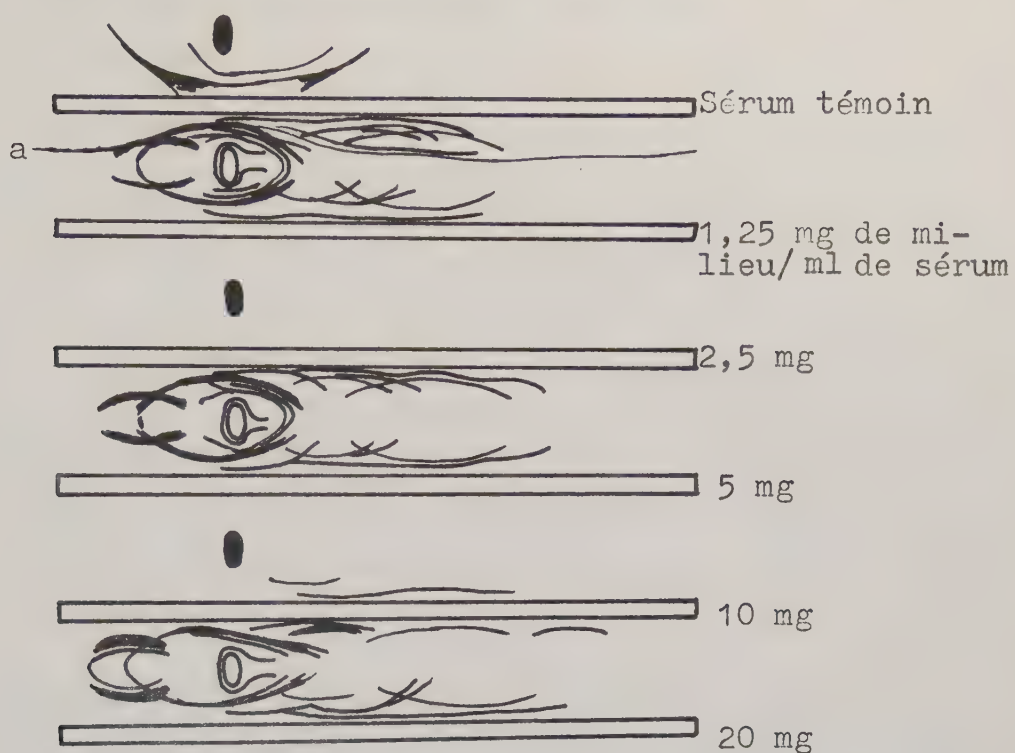


- Ag_HK9

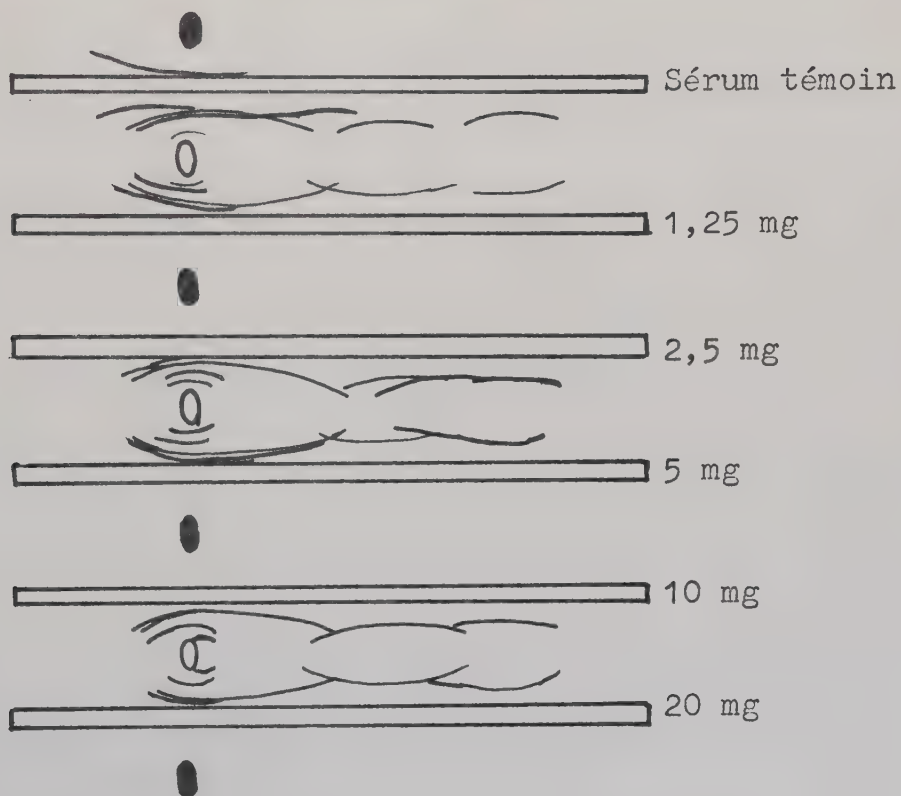


TABLÉAU IV

SATURATION EN MILIEU (TYI) DE L'ANTIGENE AS AXENIQUE



SATURATION EN MILIEU (bact) DE L'ANTIGENE ASb



TABLÉAU V

b) Technique de raccordement des arcs
(tableaux IV et V)

La deuxième rigole présente une certaine concentration d'antigène milieu (1,25 mg /ml de sérum). Au cours de la réaction, ces éléments protéiques diffusent à partir de la rigole de façon linéaire. Il se produit ainsi des bandes rectilignes de précipitation face aux sérums témoins (une bande a avec l'antigène NIH 200 et AS, deux bandes a et b avec l'antigène HK9). Ces mêmes éléments protéiques sont contenus dans le puits et ont subi la migration pendant l'électrophorèse. Il se produit ainsi, à l'approche de la zone de migration de ces protéines, un raccordement des bandes avec les arcs de précipitation.

Un coup d'oeil rapide nous permet de repérer les arcs non spécifiques. Cette méthode est donc très intéressante pour les localiser.

4 - RESULTATS AVEC LES SERUMS HUMAINS

4. 1 - Sujets en bonne santé

Le sérum de sujets en bonne santé, (de B1 à B10), ont été étudiés en I.F. et I.E. afin de servir de témoins aux réactions sérologiques.

4. 1. 1 - En immunofluorescence

En I.F., aucune réaction n'est positive. On remarque néanmoins 2 réactions discrètement fluorescentes au 1/40 avec l'antigène ASb, (B7 et B10). Ce phénomène semble lié à la présence de la flore bactérienne.

4. 1. 2 - En immunoélectrophorèse (tableau VI)

a) Avec l'antigène axénique

- Vis-à-vis de l'antigène amibe

Un arc fort à la zone de migration maximale est retrouvé avec 2 sérums, (B8 et B10). Il existe une similitude parfaite entre les 3 antigènes axéniques ; seul un arc supplémentaire est noté près du puits pour le sérum B10 face à l'antigène AS.

- Vis-à-vis de l'antigène milieu

Un seul sérum, (B5) est responsable d'un petit arc flou et faible près du puits, à migration légèrement cathodique. Il est absent avec les antigènes amibes.

b) Avec l'antigène ASb

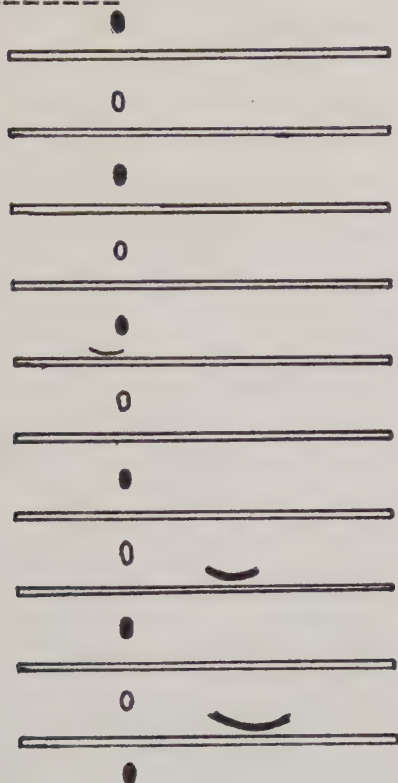
Il n'existe pas d'arc de précipitation des sérums contre l'antigène amibe et l'antigène bactérie.

TABLEAU VI

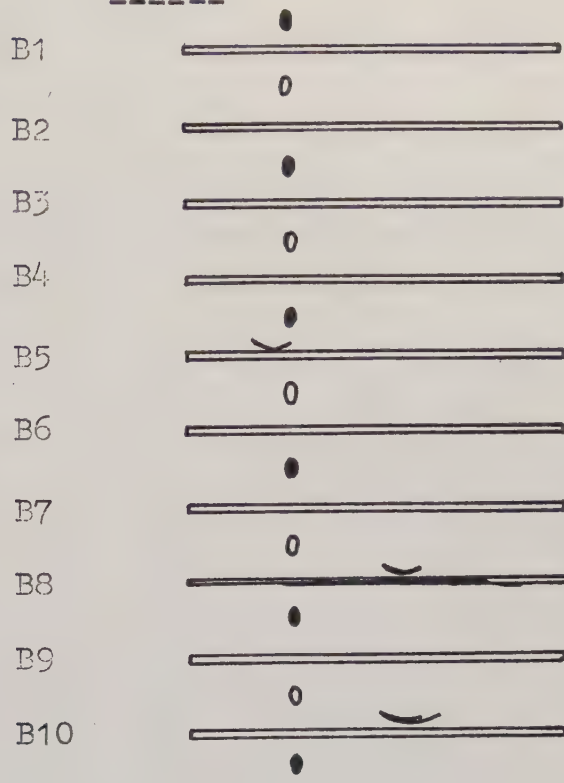
(chaque sérum est testé face à l'antigène milieu et l'antigène amibe ; les puits de couleur noire correspondent sur les schémas à l'antigène milieu).

ELECTROPHORESE DE SERUMS DE 10 SUJETS EN BONNE SANTE

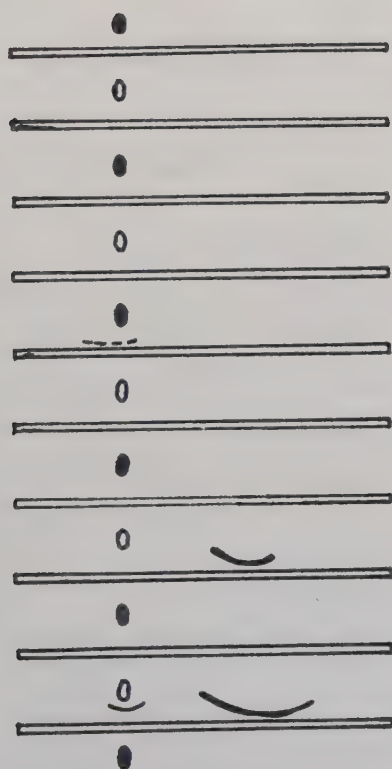
Ag_NIH_200



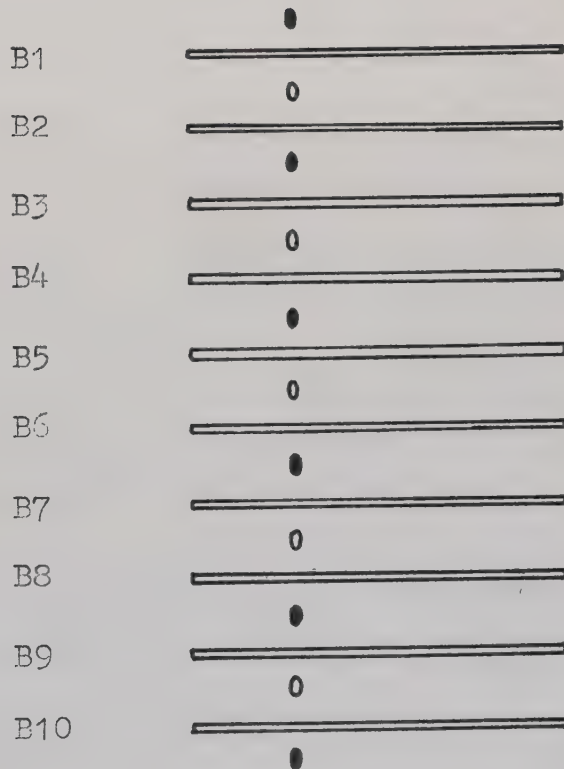
Ag_HK9



Ag_AS



Ag_ASb



4. 2 - Sujets amibiens connus

4. 2. 1 - En immunofluorescence

Les sérums de 10 sujets amibiens connus, (amibiases intestinales et/ou hépatiques) ont été passés en réaction d'I.F. contre les 4 antigènes :

	NIH 200	HK 9	AS	ASb
A1	40	80	80	80
A2	320	320	320	320
A3	80	80	160	80
A4	320	320	320	320
A5	40	40	40	80
A6	40	40	40	80 f
A7	80	160	160	80
A8	320	320	320	320
A9	320	320	320	160
A10	640	640	640	640

En conclusion :

- Il n'existe pas de différence significative (supérieur à une dilution) entre les différents antigènes.

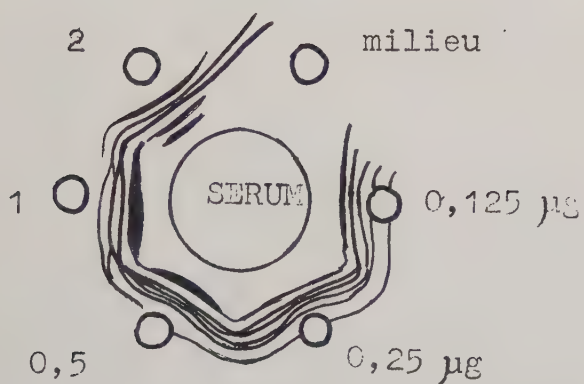
- Il est à noter que l'extinction de la fluorescence, avec l'antigène NIH 200 est franche d'une dilution à l'autre, alors qu'avec les autres antigènes, l'extinction étant moins nette, l'appréciation est plus difficile. (cette observation n'a été faite que sur le lot unique utilisé, il serait intéressant de voir si ce phénomène se répète sur d'autres lots).

- Nous ne reviendrons pas sur les difficultés de lecture avec l'antigène ASb liées à la présence de l'amidon.

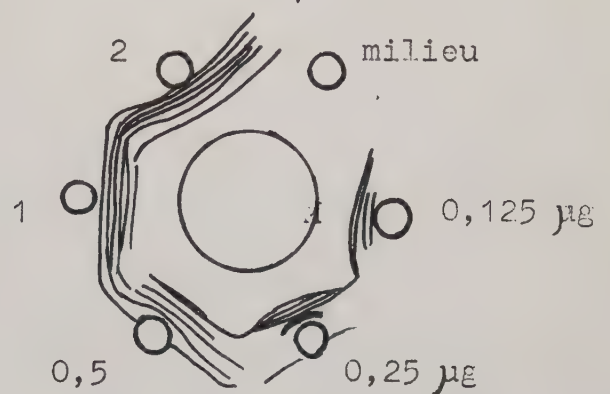
4. 2. 2. - Immunoprécipitation

a) En immunodiffusion

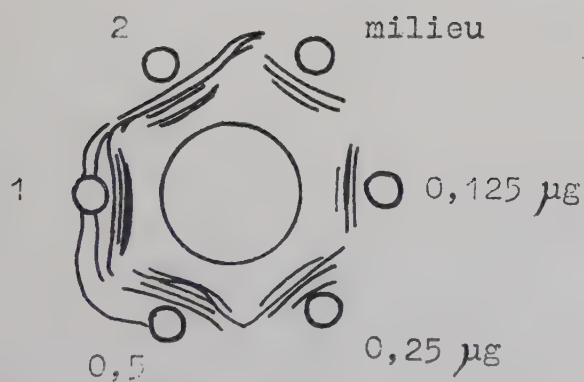
A partir d'un sérum d'amibien connu, nous avons pu étudier, grâce à la technique d'immunodiffusion, la valeur de nos antigènes. Nous avons pu ainsi établir les concentrations d'antigènes les meilleures pour les réactions d'immunoprécipitation.



NIH 200



HK 9



AS



ASb

b) En immunoélectrophorèse

10 sérums d'amibiens ont été passés en I.E., dont 3 sont communs avec ceux passés en I.F. (A1, A7, A9). Les résultats sont les suivants :

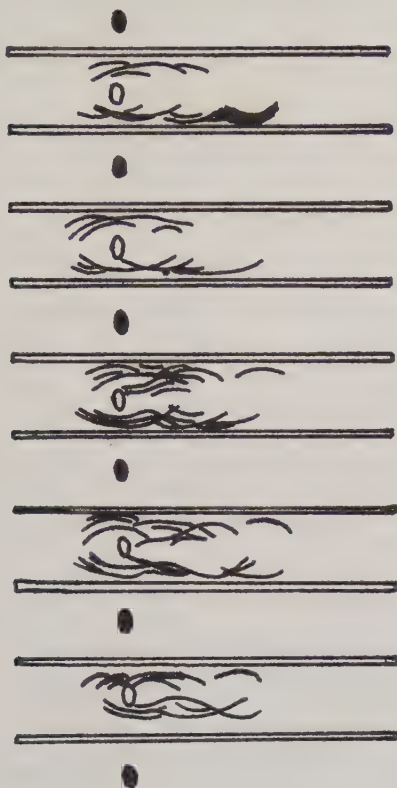
	I.F.	Nombre d'arcs en I. E.				
		HK9 SERUM frais	HK9	NIH 200	AS	ASb
A1	40	5	4	4	3	4
A'2	80	4	3	6	3	3
A'3	40	5	3	4	1	2
A'4	320	6	4	5	5	2
A'5	320	11	6	9	3	1
A'6	320	10	6	7	3	1
A7	80	9	5	8	5	0
A'8	160	5	6	7	3	1
A9	640	9	4	6	6	0
A'10	5120	8	2	5	3	1

c) Conclusions

-- Contrairement aux résultats obtenus avec l'antigène figuré, il existe un certain nombre de différences entre les souches : des 3 antigènes axéniques, NIH 200 apporte le plus d'arcs, suivi par HK9, puis AS. Les électrophorégrammes obtenus avec les 3 antigènes sont donnés par le tableau VII :

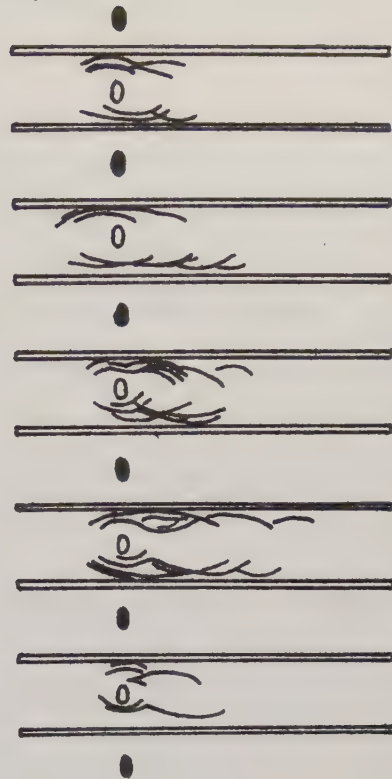
ELECTROPHORESE DU SERUM DE 10 AMIBIENS CONNUS

Ag NIH 200

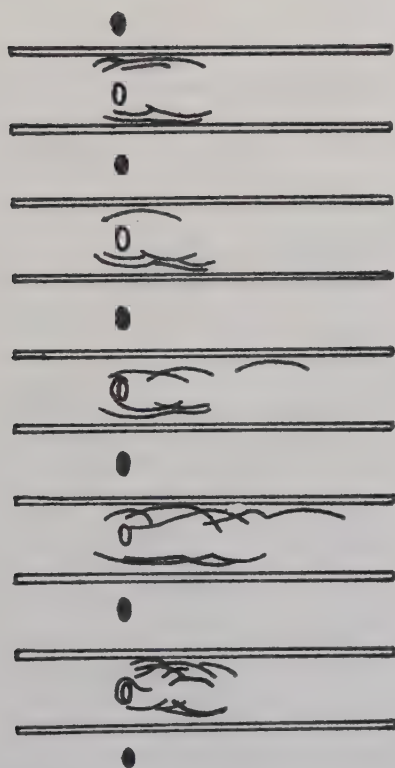


Ag HK9

A1
A'2
A'3
A'4
A'5
A'6
A7
A'8
A9
A'10

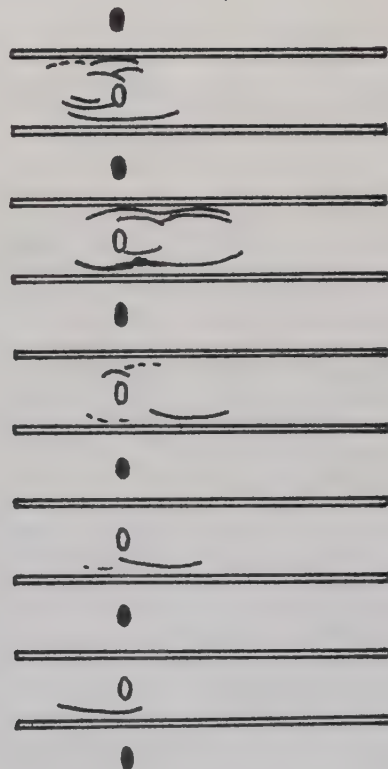


Ag AS



Ag ASb

A1
A'2
A'3
A'4
A'5
A'6
A7
A'8
A9
A'10



- On ne peut distinguer amibiase hépatique et amibiase intestinale.
- Les sérums sont congelés à -20°C et conservés depuis un laps de temps inférieur à 1 an $\frac{1}{2}$, néanmoins on note une diminution du nombre d'arcs dans les sérums conservés. Il nous faut aussi préciser que l'antigène HK9 initial était fait à partir de la souche cultivée sur milieu TPST. Par ailleurs, en I.F., la baisse du taux de dilution est d'1 degré au maximum.
- Il n'existe pas d'arcs contre les antigènes milieux tant avec TYI que bact.
- Comme dans les autres expériences d'I.D. et I.E., l'antigène ASb soluble donne des réactions faibles vis-à-vis des sérums de malades, (A7 et A9 sont négatifs alors qu'ils présentent respectivement 8 et 6 arcs avec NIH 200). Un maximum de 4 arcs est révélé par cet antigène.
- La comparaison entre AS axénique et AS bactérie révélée par les sérums de malades s'avère très difficile en raison de la faible réactivité de l'antigène ASb. Il ne semble pas exister de corrélations entre les 2 antigènes.
- NIH 200 s'avère la souche qui, entre nos mains, fournit le meilleur antigène ; néanmoins, les souches HK9 et AS axéniques sont valables dans un but diagnostique.

4. 3 - Affections non amibiennes

4. 3. 1 - En immunofluorescence

Nous avons passé les sérums de 30 sujets présentant des affections intestinales et hépatiques non amibiennes vis-à-vis des 4 antigènes

Les résultats sont les suivants :

		NIH 200	HK9	AS	ASb
<u>Cirrhoses</u>	C1	-	-	-	-
	C2	-	40 f	40 f	-
	C3	-	-	-	40
	C4	40	40	80	40
	C5	40	40	40 f	80
	C6	80	80	160	160
	C7	-	-	-	-
	C8	-	40 f	40	80
	C9	80	80	40	80
	C10	-	40	40	40 f
	C11	80 f	80	80	80
	C12	40	-	-	40
	C13	40 f	40	40	-
	C14	-	40 f	-	40
	C15	80 f	40	80	40
	C16	40 f	40	-	40
	C17	-	-	-	-
	C18	-	40 f	40 f	40 f
	C19	-	40	40 f	40 f
	C20	-	-	-	40 f
	C21	-	-	-	-
	C22	40 f	-	40 f	40
	C23	40	-	-	40
	C24	-	-	-	-
<u>Hépatites virales</u>	H1	40	40	-	-
	H2	-	-	-	-
	H3	-	-	-	-
<u>Divers</u>	RCH	-	-	-	-
	Colite	-	-	-	-
<u>Tumeur postérieure du foie</u>		40 f	40	-	-

Un certain nombre présente une positivité à un degré de dilution supérieur au 1/40 (seuil de spécificité du laboratoire avec l'antigène axénique).

Il n'existe pas de différence significative entre les 4 antigènes figurés comme dans le cas des sérums d'amibiens ; un degré de dilution de différence au maximum étant retrouvé. Dans ces cas, ce sont AS et ASb qui présentent généralement le taux de dilution le plus élevé.

Nous a paru particulièrement intéressant le groupe de 24 cirrhotiques, on retient :

- 7 sérums négatifs,
- 12 sérums positifs au 1/40 (seuil de spécificité),
- 4 sérums positifs au 1/80,
- 1 sérum positif au 1/160.

4. 3. 2 - En immunoélectrophorèse (tableau VIII)

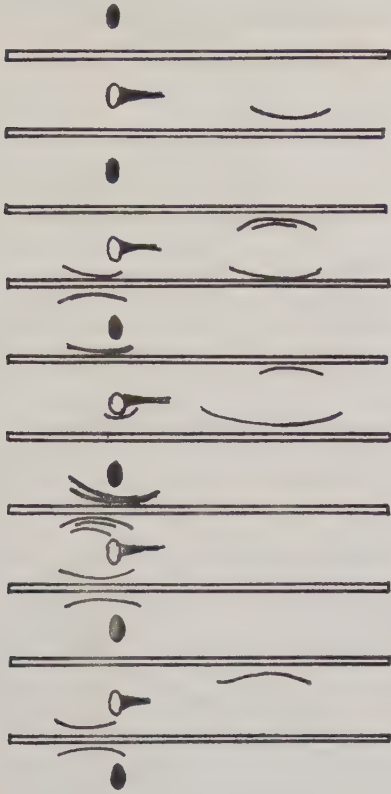
Au hasard, les 10 premiers de la série ont été passés en I.E. (9 cirrhotiques - C1 à C9 - et 1 hépatite virale - H1).

Il est étonnant de constater que

- la proportion de sérums présentant des arcs de précipitation est de 10 sur 10 pour ce lot alors que pour les sérums de sujets en bonne santé, elle n'est que de 2 sur 10.
- d'autre part, ces précipités peuvent être nombreux (jusqu'à 6 arcs) et disposés sur l'électrophorégramme de façon trompeuse.
- la majorité des arcs observés se voit vis-à-vis de l'antigène amibe et non de l'antigène milieu.

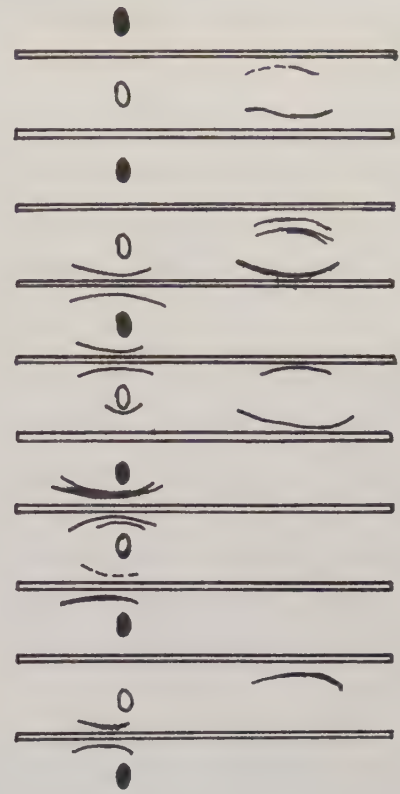
ELECTROPHORESE DE 10 SUJETS, NON AMIBIENS, HEPATIQUES (cirrroses)

Ag NIH 200

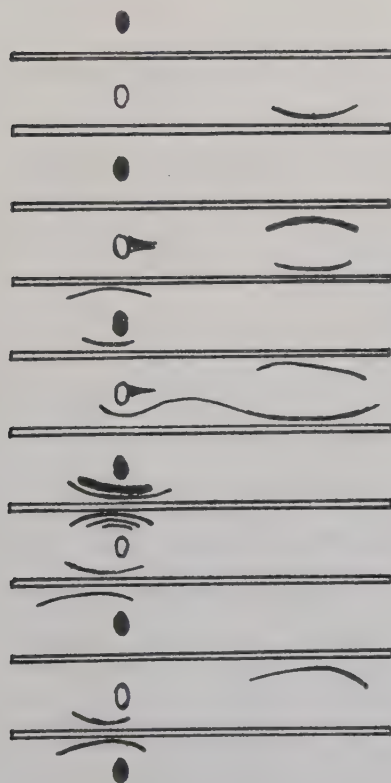


Ag HK9

C1
H1
C2
C3
C4
C5
C6
C7
C8
C9



Ag AS



Ag ASb

C1
H1
C2
C3
C4
C5
C6
C7
C8
C9

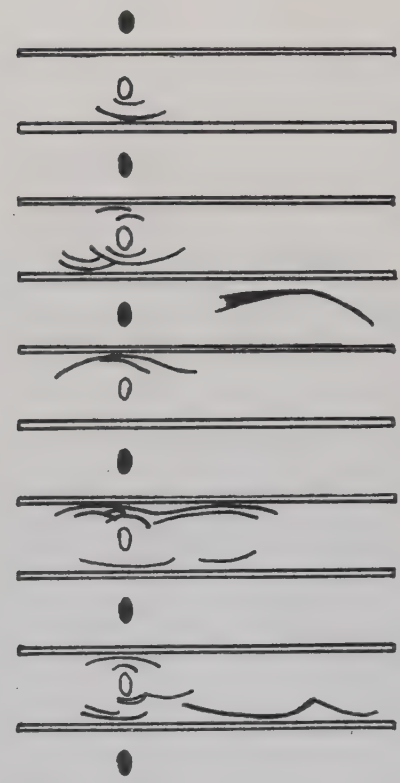


TABLEAU VIII

- contre l'antigène axénique, s'individualisent 2 types d'arcs :
 - pour 5 sérums (C3, C4, C6, C7, C9), vis à vis de l'antigène TYI, on note la présence d'arcs qui sont retrouvés semblables mais moins forts face à l'antigène amibien. Ce groupe d'arcs se situe à proximité du puits en position légèrement cathodique.
 - les 6 autres sérums (H1, C2, C3, C4, C5, C8) forment avec l'antigène amibien axénique un précipité en position très anodique.
- il existe comme pour les sérums témoins une parfaite similitude dans les résultats des 3 antigènes axéniques, alors que des différences notables sont rencontrées avec les sérums d'amibiens.
- il n'existe pas de correspondance entre les résultats obtenus avec les antigènes axéniques et l'antigène mixte (ASb).
- un seul sérum (C3) donne un arc vis-à-vis de l'antigène bactérie. Nous ne pouvons interpréter cet arc isolé situé près de la cathode.
- Contrairement aux faibles réactions obtenues avec l'antigène ASb face aux sérums d'amibiens, des arcs nets et épais apparaissent face aux sérums de cirrhotiques.

4. 3. 3. - Expérience de saturation des sérums
faussement positifs par un extrait de
foie humain

FAUBERT, (28), démontre en F.C. l'existence d'anticorps antifoie chez les amibiens. Cet auteur se demandait si ceux-ci ne joueraient pas un rôle dans les réactions sérologiques amibiennes.

De la même façon, l'on pouvait penser que, chez des sujets hépatiques, d'éventuels anticorps antifoie pouvaient être à l'origine des fausses positivités recensées. Aussi, nous avons saturé des sérums par de l'extrait de foie humain à des degrés de concentration croissante. Après saturation, 10 sérums de cirrhotiques ont été testés en I.F., et 1 en I.D.. L'absence de modification des résultats ne nous a pas encouragé à poursuivre plus en avant cette expérience.

5 - CONCLUSIONS DES TRAVAUX PERSONNELS

Par l'étude des sérums hyperimmuns de lapins d'une part et de sérums humains, tant anibiens que de sujets sains, ou atteint d'affections diverses, nous arrivons aux conclusions suivantes :

1) Pour l'antigène figuré d'E. histolytica :

Les 4 antigènes se révèlent être de valeur sensiblement identique. Deux points particuliers sont à signaler : d'une part, une sensibilité légèrement plus importante de la souche AS, d'autre part la plus grande difficulté de lecture des réactions utilisant l'antigène mixte.

2) Avec ce même antigène, on constate chez quelques sujets témoins en bonne santé, l'existence d'une discrète fluorescence, à des taux de dilution ne dépassant pas le 1/40, qui pourrait être due à la flore bactérienne associée.

3) Pour l'antigène soluble, les 4 antigènes sont de valeurs différentes ; les 3 souches axéniques permettent de fabriquer des antigènes de qualités satisfaisantes (le meilleur étant NIH 200 et le moins bon AS).

L'antigène soluble obtenu à partir de la souche polyxénique se révèle très médiocre.

4) L'existence de réactions faussement positives ne semble pas être liée à la qualité de l'antigène.

5) Dans notre série, il n'existe pas de réactions positives tant en I.F. qu'en I.E. avec les sujets en bonne santé.

6) Par contre, vis à vis de sujets cirrhotiques, nous constatons :

- une I.F. positive jusqu'à la dilution de 1/160 dans 1 cas sur 24 cirrhotiques.
- en I.E., la présence de précipités dans les 10 cas : avec l'antigène axénique sous forme de 2 types d'arcs relativement constants, alors que pour l'antigène mixte, la variété des électrophorégrammes est telle que nous n'arrivons à aucune systématisation.

o

o

o

CONCLUSIONS GENERALES

Les "faux positifs" existent dans la réaction sérologique de l'anibiase.

L'expérience des différents chercheurs et notre propre étude de sérums de cirrhotiques, utilisant l'antigène classique et l'antigène axénique en immunofluorescence et immunoélectrophorèse, nous permet de confirmer leur existence.

Une partie des "faux positifs" peut être éliminée par l'utilisation de techniques offrant le maximum de spécificité (nous avons ainsi été amenés à retenir les réactions d'immunofluorescence et d'immunoélectrophorèse) et par l'utilisation d'antigènes axéniques offrant un plus grand degré de pureté.

Néanmoins, l'on rencontre des maladies à l'origine de réactions sérologiques faussement positives. Nous avons exploré essentiellement des affections hépatiques diverses : cancers primitif et secondaire du foie, hépatites et surtout cirrhoses.

A partir de réactions sérologiques valables, et d'un antigène de bonne qualité, se trouvant face à une sérologie positive, il convient, afin de confirmer un diagnostic, de considérer :

- la région d'où provient le malade (cas des anibiases asymptomatiques ou anciennes avec anticorps résiduels),
- les éléments de clinique,
- la quantité relative des anticorps,
- les pathologies hépatiques auxquelles peuvent correspondre de "faux positifs" et l'aspect immunoélectrophorétique de leurs précipités.

Le président de thèse :

J. COUDERT

Vu et permis d'imprimer
Lyon, le 25 septembre 1980

Le président de l'université
Claude Bernard,
Président du comité de coordination des études médicales :

Le doyen de l'U.E.R.
Faculté de médecine
Grange-Blanche

D. GERMAIN

P. ZECH

B I B L I O G R A P H I E

- 1 - ABIOYE A.A., LEWIS E.A. et MACFARLANE H.

Clinical evaluation of serum immunoglobins in amoebiasis.

. Immunol., 1972, 23 : 937-946.

- 2 - AHMED L.

Intérêt de la réaction d'immunopéroxydase indirecte dans le sérodiagnostic de l'amibiase.

. Bull. Soc. Path. Ex., 1977, 70, (2) : 155-160.

- 3 - ALI KHAN Z. et MEEROVITCH E.

A comparative study of the antigens of some histolytica type strains of Entamoeba.

A qualitative and quantitative evaluation of antigens by indirect hémagglutination, precipitation and immunoelectrophoresis.

. Am. J. Trop. Med. Hyg., 1968, 17 : 528-538.

- 4 - AMBROISE-THOMAS P.

Etude séro-immunologique de 10 parasites par les techniques d'immuno-fluorescence.

. Thèse LYON, 1969.

- 5 - BALAMUTH W. et WIEBOLDT M.L.

Comparative growth cycles of Entamoeba histolytica with different combination of bacteria.

. Am. J. Trop. Med., 1951, 31 : 192-205.

- 6 - BELTRAN F. et BIAGIF F.

Antibodies against Entamoeba histolytica at different ages.

. Bio. Med. Hosp. Infant. MEXICO, 1962, 3 : 165-170.

- 7 - BENEX J.

Extraits antigeniques spécifiques obtenus à partir d'Entamoeba histolytica maintenues en culture mixtes.

1) Obtention, caractérisation chimique et immunologique des extraits.

2) Séparation et analyse de fractions spécifiques à partir de l'antigène.

. Ann. Inst. Pasteur, 1971, 46 : 533-544
545-552.

- 8 - BOMPART J., GENDRE J.P., ROMANO P., MOUIN R. et
LE QUINTREC Y.

Réaction d'immuno-fluorescence amibienne positive
au cours d'un cancer secondaire du foie.
. Arch. Fr. Mal. App. Dig., 1976, 65 : 235-238.

- 9 - BOS H.J. et VAN DE GRIEND R.J.

Virulence and toxicity of axenic Entamoeba histo-
lytica.
. Nature, 1977, 265, (5592) : 341-343.

- 10 - BOS H.J. et all

The value of serodiagnosis in amoebiasis.
. Ned. Tijdschr Geneesk, 1977, 121, (7) :
287-290. (en néerlandais).

- 11 - BRAY R.S. et HARRIS W.G.

Cellular liver immune responses to amoebic liver
abcess in the guinea pig.
. Clin. Exp. Immunol., 29, (1) : 147-151.

- 12 - CAPRON A., VERNES A., NIEL G. et BOUVRY M.

Le diagnostic immunologique de l'amibiase.
. LILLE Médical, 1971, 16, (9) : 1346-1347.

- 13 - CHANG S.M.

Antigenic analysis of two axenised strains of
Entamoeba histolytica by two dimensional immuno-
electrophoresis.
. Am. J. of Trop. Med. Hyg., 1979, 28
(5) : 845-853.

- 14 - CHARMOT G.

Intérêt pratique des réactions immunologiques de
l'amibiase.
. LYON Médical, 1971, 225, n° spécial 145.

- 15 - COLE B.A. et KENT J.F.

Immobilization of Entamoeba histolytica in vitro
by antiserum produced in the rabbit.
. Proc. soc. exp. biol. and med. 1953, 83 : 811-814.

- 16 - COUDERT J., GARIN J.P., AMBROISE-THOMAS P. et GEORGET J.P.

Diagnostic sérologique de l'amibiase par immuno-
fluorescence, résultats de 160 examens.
. Bull. Soc. Path. Exot., 1967, 60, (1) : 44-52.

- 17 - COUDERT J., GARIN J.P., AMBROISE-THOMAS P., KIEN TRUONG T.
et GEORGET J.P.

Diagnostic sérologique de l'amibiase par immuno-
fluorescence.
. Presse médicale, 1968, 76 : 1721-1722.

- 18 - COUDERT J., KIEN TRUONG T., AMBROISE-THOMAS P. et
GEORGET J.P.

Etude antigénique de 6 souches d'Entamoeba histo-
lytica par immunofluorescence indirecte.
Résultats comparés pour une des souches des étales-
ments sur lames et des coupes de congélation.
. Bull. Soc. Path. Exot., 1968, 61 : 365-372.

- 19 - DAS S.R. et NEAL R.A.

Immunological studies in amoebiasis.
. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 1970, 64 : 472.

- 20 - DASGUPTA A.

Immunoglobulin in health and disease.
Immunoglobulins in the sera of patients with
amoebiasis.
. Clin. Exp. Immunol., 1974, 16, (2) : 163-167.

- 21 - DEKOWNINCK

Réactions croisées de la technique d'immunofluo-
rescence appliquées au diagnostic de l'amibiase.
. Thèse médecine, PARIS, Val de Marne, 1976.

- 22 - DELLAMONICA

Pouvoir pathogène et phénomène séro-immunologique
d'Entamoeba histolytica.
. Thèse C.E.S., B.H. LYON, 197.

23 - DESCHIENS R.

L'amibiase et l'amibe dysentérique.
. Monographie de l'Institut Pasteur, Masson,
Editeur, 1965.

24 - DIAMOND L.S.

Techniques of axenic cultivation of Entamoeba histolytica like amoebae and Entamoeba histolytica SCHAUDINN, 1903.
. J. Parasitol., 1968, 54, (5) : 1047-1056.

25 - DIAMOND L.S., HARLOW D.R. et CUNNICK C.C.

A new medium for the axenic cultivation of Entamoeba histolytica and other Entamoeba.
. Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg., 1978, 72,
(4) : 431-432.

26 - DWYER D.M.

Analysis of the antigenic relation-ship among
Trichomonas, Histomonas, Dientamoeba and Entamoeba.
1) Quantitative fluorescent antibody methods.
. J. Protozool, 1972, 19, (2) : 316-332.
2) Gel diffusion methods.
. J. Protozool, 1974, 21, (1) : 139-145.

27 - ELSDON DEW R.

Immunology in amoebiasis.
. The Leech, 1965, 5 : 116-120.

28 - FAUBERT G.M., MEEROVITCH E. et MACLAUGHLIN J.

The presence of liver auto-antibodies induced by
Entameoba histolytica in the sera from both natural-
ly infected human and immunised rabbits.
. Am. J. Trop. Med. Hyg., 1978, 27, (5) : 892-896.

29 - FELGNER P.

Some aspect of immunodiagnostic in amoebiasis.
. Tropen. Med. Parasit., 1976, 27, (2) : 165.

30 - FOLEY T.H. et al

Misdiagnosis of amoebiasis.
. Br. Med. J., 1978, 2, (6134) : 379-380

- 31 - GASTAUT J.A., RANQUE P.H. et QUILICI M.

Expérience de l'immunofluorescence et de la réaction d'agglutination dans le diagnostic de l'amibiase.

. Marseille Médicale, 1972, 109 : 627-629.

- 32 - GENTILINI M. et NIEL G.

Immunofluorescence et diagnostic sérologique de l'amibiase.

. Revue de Médecine n° 35, 1972, 2305-2308.

- 33 - GEORGET J.P.

Le diagnostic sérologique de l'amibiase par immunofluorescence. 560 examens.

. Thèse médicale, LYON, 1967.

- 34 - GOLD D., NORMANN L.G., MADDISON S.E. et KAGAN I.G.

Immunological studies on hamster infected with Entamoeba histolytica.

. Parasitol., 1978, 74, (5) : 866-873.

- 35 - GOLDMAN M.

Evaluation of a fluorescent antibody test for amoebiasis using two widely differing amoeba strains as antigen.

. Am. J. Trop. Med. Hyg., 1966, 15 : 694-700.

- 36 - GOLDMAN M. et CANNON T.L.

Antigenic analysis of Entamoeba histolytica by means of fluorescent antibody. Comparison of 15 strains of Entamoeba with information on their pathogenicity to guinea pigs.

. Am. J. Trop. Med. Hyg., 1967, 16 : 245-254.

- 37 - GOLDMAN M. et SIDDIQUI W.A.

Antigenic comparison of two substrains of Entamoeba histolytica by gel diffusion and immunoelectrophoresis.

. Exper. Parasit., 1965, 17, (3) : 326-331.

38 - HARRIS W.G.

Serial measurement of total and parasite specific Ig Entamoeba in an african population infected with Entamoeba histolytica.

. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 1972, 72, (4) : 427-430.

39 - JEANES A.J.

Immunofluorescent diagnosis of amoebiasis.

. Brit. Med. J., 1964, (5423) : 1531.

40 - JEANES A.L.

Evaluation in clinical practice of the fluorescent amoebic antibody test.

. J. Clin. Path., 1969, 22 : 427-429.

41 - JEANES A.L. et PATH M.L.

Indirect fluorescent antibody test in diagnostic of hepatic amoebiasis.

. Brit. Med. J., 1966 : 1464.

42 - JOURNE B.

Le sérodiagnostic de l'amibiase : notre expérience dans les méthodes d'immunofluorescence, d'hémagglutination, d'agglutination au latex et Elisa.

. Thèse de médecine, faculté de médecine MARSEILLE, 1978, 90 p., 92 réf.

43 - JUNIPER K., WORRELL Cl., MINSCKEN et al

Serologic diagnostic of amoebiasis.

. Am. J. Trop. Med. Hyg., 1972, 21, (2) : 157-168.

44 - KLEY S.

Falsch positive Ergebnisse mit dem Latex Fixation Test auf Australia, (S.H.), Antigen durch Médikamente.

. Dtsch. Med. Wschr., 1972, 97 : 1547-1548.

45 - KOTCHER E., MIRANDA et SALGADO

Correlation of clinical, parasitological and sérological data of individuals infected with Entamoeba histolytica.

. Gastroenterology, 1970, 58 : 388-391.

46 - KRUPP I.M.

Immunoelectrophoretic analysis of several strains of Entamoeba histolytica.

. Am. J. Trop. Med. Hyg., 1966, 15 : 849-854.

47 - KRUPP I.M.

Antibody response in intestinal and extra-intestinal amoebiasis.

. Am. J. Trop. Med. Hyg., 1970, 19 : 57-62.

48 - KRUPP I.M.

Definition of the antigenic pattern of Entamoeba histolytica and immunoelectrophoretic analysis of the variation of patient response to amebic disease.

. Am. J. Trop. Med. Hyg., 1977, 26, (3) : 387,392.

49 - KRUPP I.M. et POWELL S.J.

Comparative studies of the antibody response in amoebiasis. Persistence after successful treatment.

. Am. J. Trop. Med. Hyg., 1971, 20 : 421-424.

50 - LAARMAN J.J. et all.

Evaluation of serological diagnosis of invasive amoebiasis in clinically suspected patients.

. Ann. Soc. Belge Med. Trop., 1975, 55, (5): 571-577.

51 - LUNDE M.N. et DIAMOND L.S.

Studies on antigens from axenically cultivated Entamoeba histolytica and Entamoeba histolytica-like amoebae.

. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1969, 18 : (1) : 1-6.

52 - MADDISON S.E.

Characterization of Entamoeba histolytica antigen-antibody reaction by gel diffusion.

. Expl. Parasit., 1965, 16 : 224-235.

53 - MADDISON S.E. et ELSDON-DEW R.

Non specific antibodies in amoebiasis.

. Exp. Parasitol., 1961, 11 : 90-92.

- 54 - MADDISON S.E., KAGAN I.J. et ELSDON-DEW R.

Comparison of intradermal and serologic tests
for the diagnosis of amoebiasis.
. Am. J. Trop. Med. Hyg., 1968, 4 : 540-547.

- 55 - MADDISON S.E., KAGAN I.G. et NORMAN L.

Reactivity of human immunoglobulins in amoebiasis.
. J. immunol., 1968, 100 : 217-228.

- 56 - MICHEL R. et WESTPHAL A.

Zytochemische Untersuchungen an Entamoeba histo-
lytica in Bakterien haltigen und bakterienfreien
Kulturen.
. Ztsch. Trop. Parasit., 1970, 21, (4) : 372-382.

- 57 - MILLER M.J., SCOTT F. et FOSTER E.F.

An evaluation of immunological indicators for
amoebic disease prevalence.
. Am. J. Trop. Med. Hyg., 1973, 22, (3) : 331-336.

- 58 - MITHAL S. et al

Indirect fluorescent antibody test in amoebiasis
using axenic Entamoeba histolytica.
. Indian J. Med. Res., 1978, 67 : 367-373.

- 59 - MOHAPATRA T.M.

Evaluation of parasitological and serological
techniques in diagnosis of amoebiasis.
. Trop. Med. Parasitol., 1979, 30, (1) : 53-58.

- 60 - MOLET B.

Contribution à l'étude des cultures d'amibes.
. Thèse médecine, faculté de médecine de STRASBOURG,
1972, n° 76, 189 p., 385 réf.

- 61 - MOLINIER A. et MIMOUNE G.

Notre expérience de la réaction indirecte d'immuno-
fluorescence dans les affections amibiennes.
. Arch. Fr. Mal. App. Dig., 1971, 60 : 535-546.

62 - MYJAK P.

Comparative studies of the antigenic properties of some indigens and imported strains of Entamoeba histolytica.

. Bull. Inst. Mar. Med. GDANSK, 1970, 21, (3-4) : 89-103.

63 - NAYEBI D.

Immunofluorescent technique for diagnosis of Entamoeba histolytica strains.

. Med. Lab. Technol., 1971, 28, (4) : 413-416.

64 - NEAL, ROBINSON, LEWIS et KESSEL

Comparison of clinical observations on patients infected with Entamoeba histolytica, with serological titres of their sera and virulence of their amoebae to rats.

. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 1968, 62, (1) : 69-75.

65 - NECHALI D.

Association amibiase intestinale aigue et rectocolite hémorragique. Incertitudes pathogéniques.

. Bull. Soc. Path. Exot., 1978, 71, (3) : 257-262.

66 - NIEL G., GENILLINI M., CHARMOT G. et COUTURE J.

Le test au latex appliqué au diagnostic sérologique de l'amibiase. Valeur comparée à celle de l'immunofluorescence et de l'immunoélectrophorèse.

. Bull. Soc. Path. Exot., 1972, 65, (3) : 382-390.

67 - NORCOTT T.C.

Experience with the Entamoeba histolytica fluorescent antibody test in Western Australia.

. Med. J. Aust., 1973, 7 : 21-22.

68 - NOZAIS J.P., CONDAT J.M., SCHMIDT D., CISSE D. et DOUCET J.

Valeur de l'immunofluorescence indirecte dans le diagnostic et le pronostic de l'amibiase intestinale et extra-intestinale dans une région de haute endémicité.

. Med. Trop., Mars 1979, 39, (1) : 81-85.

- 69 - PRAKASH O., SAMA S.K., VINAYAK V.K. et BHALLA I.

Evaluation of a new antigen for hemagglutination test in amoebiasis.

. Am. J. Trop. Med. Hyg., 1970, 19 : 418-421.

- 70 - ROBINSON G.L.

The laboratory diagnosis of human parasitic amoebae.

. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 1968, 62, (2) : 285.

- 71 - ROBINSON G.L.

The preparation of amoebic extracts and their testing by complement fixation against clinically proved area.

. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 1972, 66, (3) : 435-449.

- 72 - SAID FERNANDEZ S. et LOPEZ-REVILLA R.

Characteristic protein electrophoretic patterns of four Entamoeba histolytica.

. Z. Parasiten Kd, 1978, 56 : 219-225.

- 73 - SANOGO B.

Apport du diagnostic sérologique dans les complications viscérales de l'Amibiase, (enquête effectuée à BAMAKO).

. Thèse médecine LYON, 1979, 92 p., 123 réf.

- 74 - SAVANAT T. et CHAICUMPA W.

Immuno-electrophoresis test for amoebiasis.

. Bull. W. H. O., 1969, 40 : 343-353.

- 75 - SAWHNEY S., CHAKRAVARTI R.N., PARMEEL-JAIN et VINAYAK V.K.

Immunogenicity of axenic Entamoeba histolytica antigen and its fractions.

. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 1980, 74, (1) : 26-29.

- 76 - SCHNEIDER C.R. et GORDON R.M.

The effect of medium components on the specificity of axenic Entamoeba histolytica antigen.

. J. Parasitol., 1968, 54 : 711-714.

- 77 - SEN A., GHOSH S.N., MUKERJEE S. et RAY J.C.
Antigenic structure of Entamoeba histolytica.
. Nature, 1961, 192, (4805) : 893.
- 78 - SHER A. et AHMAD S.
Detection and characterization of humoral antibodies from amoebic immune sera.
. Indian J. Exp. Biol., 1977, 15, (12) : 1083-1088.
- 79 - STAMM W.P., ASHLEY M.J. et BELL K.
The value of amoebic serology in an area of low endemicity.
. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 1976, 70, (1) : 49-53.
- 80 - STEIN B. et TALIS B.
Routine diagnosis of amoebiasis by the passive hemagglutination test, using local Entamoeba histolytica soluble antigen.
. J. of Protozool., 1971, 18, (abstracts n° 128) : 35.
- 81 - TALIS B.
Varying antigenicity within Entamoeba histolytica strains.
. J. of Protozoal., 1979, 18, (abstracts n° 18) : 35.
- 82 - TALIS B., LAHAV M. et BEN EFRAIM S.
Immunological studies on some strains of Entamoeba histolytica.
. Bull. Res. Counc. of ISRAEL, 1963, 10E, (3-4) : 130-136.
- 83 - THOMPSON P.F. et coll.
Preparation and evolution of standardized amoeba antigen from axenic cultures of Entamoeba histolytica.
. Bull. O.M.S., 1968, 39 : 349-365.
- 84 - VAITUKAITIS J., ROBBINS J.B., NIESCHLAG E. et ROSS G.T.
A method for producing specific antisera with small doses of immunogen.
. J. Clin. Endocr., 1971, 33 : 988-991.

- 85 - VERNE A., PARIS J.C., BECQWORT J., CAPRON A. et PARIS J.

Valeur de la réaction d'immunofluorescence indirecte dans le diagnostic et la surveillance des hépatites amibiennes.

. Arch. Fr. Mal. App. Dig., 1970, 59 : 475-480.

- 86 - VINAYAK V.K.

Immune response of monkeys, (Macaca mulatta), to amoebic antigens.

. J. Parasitol., 1979, 65, (3) : 407.

- 87 - WALKER E.L. et SELLARDS A.W.

Experimental Entamoebic dysentery

. Phillip. J. Sci. (sec. B), 1913, 8 : 233-330.

- 88 - WERY- PASKOFF S., RENOIRTE R., WERY M. et BENNIKE T.

Diagnostic sérologique de l'amibiase par immunofluorescence.

. Ann. Soc. Bel. Med. Trop., 1971, 51 : 221-228.

- 89 - WERY - PASKOFF S., RENOIRTE R. et WERY M.

L'immunofluorescence dans le diagnostic de l'amibiase. Possibilités d'application épidémiologique.

. Ann. Soc. Bel. Med. Trop., 1974, 54, (1) : 65-71.

- 90 - WISSLER K. et al

Experiences with the serodiagnosis of amoebiasis.

. Ther. Umsch, 1979, 36, (3) : 233-240.

- 91 - WRIGHT R.

Amoebiasis : a diagnostic problem in GREAT-BRITAIN.

. Brit. Med. Journ., 1966, 1 : 954-959.

- 92 - YAP E.M., ZAMAN V. et AW S.E.

The use of cyst antigen in the sero-diagnostic of amoebiasis.

. Bull. O.M.S., 1970, 42, (4) : 553-561.

- 93 - ZROUNBA F.

Le sérodiagnostic de l'amibiase : valeur respective des réactions : immunofluorescence indirecte
fixation du complément
immunoélectrophorèse.

Thèse LYON, 1974, n° 97.

